



Πτυχιακή εργασία

Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης σε εκχυλίσματα των φυτών *Cichorium Endivia*, *Cichorium Intybus*, *Cichorium Spinosum* και *Sonchus Asper*

Assessment of antioxidant activity of plant extracts from *Cichorium Endivia*, *Cichorium Intybus*, *Cichorium Spinosum* and *Sonchus Asper*



Σαλώμη Σάββα

Λάρισα 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
2. Δημήτριος Κουρέτας Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. Σοφία Μητάκου: Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτρη Στάγκου. Αρχικά θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τις πολύτιμες συμβουλές, τις γνώσεις και τα ερεθίσματα που μου μετέδωσε σε όλη τη διάρκεια του προγράμματος σπουδών μου.

Επίσης, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα για την αμέριστη βοήθεια και το ενδιαφέρον του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς και για τη δυνατότητα που μου έδωσε, ώστε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό του.

Πολλές ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω και στην κυρία Σοφία Μητάκου, καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, και κατ' επέκταση σε όλη την ομάδα της για τις πολύτιμες και απαραίτητες πληροφορίες που μας έστειλαν για την εκπόνηση αυτής της εργασίας αλλά και για την άριστη συνεργασία που είχαμε καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων .

Οφείλω ακόμη να ευχαριστήσω, την Θάλεια Κερασιώτη για την αμέριστη βοήθειά της. Θα ήταν παράληψή μου να μην αναφέρω την απέραντη στήριξη αλλά και βοήθεια που μου έδωσε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, τόσο στην εκτέλεση των πειραμάτων όσο και στην συγγραφή της.

Θα ήταν άδικο να μην ευχαριστήσω συνολικά όλη την ομάδα του εργαστηρίου, δηλαδή τους διδάκτορες Κωσταντίνο Γερασόπουλο, και φυσικά τους υποψήφιους διδάκτορες Αλέξανδρο Πρίφτη, Υπάτιο Σπανίδη και Κούκα Παρασκευή, οι οποίοι με τις συμβουλές και την στήριξή τους αλλά και με το φιλικό κλίμα που καλλιέργησαν στο εργαστήριο βοήθησαν στο έπακρο την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας αλλά και την απόκτηση νέων γνώσεων και εμπειριών καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης αυτής της πτυχιακής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που ήταν πάντα δίπλα μου με την οικονομική αλλά πάνω από όλα την ψυχολογική στήριξη, την αγάπη, την κατανόηση

και την εμπιστοσύνη τους. Μου έδωσαν δύναμη να συνεχίσω και να φτάσω μέχρι το τέλος για αυτό και τους αφιερώνω αυτή την πτυχιακή εργασία.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AAPH	[2,2'-Azobis(2-amidinopropanehydrochloride)]	
ABTS	[azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)]	
DMSO	(Dimethyl Sulfoxide)	Διμέθυλο σουλφοξείδιο
DNA	(Deoxyribonucleic Acid)	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DPPH	(1,1-didhenyl-2-picrhydrazyl)	1,1 διφαινυλ-2-πυκριδραζύλιο
EDTA	<u>Ethylenediaminetetraacetic acid</u>	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
HDL	(High-Density Lipoprotein)	υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
HRP	(Horseradish Peroxidase)	Υπεροξειδάση
LDL	(Low-Density Lipoprotein)	χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
NFC	(Not From Concentrated)	(χυμός) μη προερχόμενος από συμπύκνωμα
PON 1	(Paraoxonase)	Παραοξονάση 1
PPAR γ	(Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma)	γ -υποδοχείς του ενεργοποιητή του πολλαπλασιασμού των υπεροξυσωματίων
RNAse	(Ribonuclease)	Ριβονουκλεάση
RNS	(ReactiveNitrogenSpecies)	δραστικέςμορφέςαζώτου
RO•	(alkoxyl radical)	ρίζα του αλκοξυλίου
ROO•	(peroxyl radicals)	ρίζες περοξυλίου
ROS	(Reactive Oxygen Species)	δραστικές μορφές οξυγόνου
SET	(SingleElectronTransfer)	μεταφορά ηλεκτρονίου

TGFb1	(Transforming Growth Bactor beta 1)	
UV	(ultra violet)	υπεριώδης ακτινοβολία
H₂O₂	(hydrogen peroxide)	υπεροξειδίο του υδρογόνου
O₂^{•-}	(superoxide radicals)	ρίζες σουπεροξειδικού ανιόντος
OH[•]	(hydroxyl radicals)	ρίζες υδροξυλίου

Πίνακας Περιεχομένων

1. Εισαγωγή	14
2. Ελεύθερες Ρίζες.....	15
2.1. Τύποι Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου.....	17
2.2. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS)-(ΔΕΟ).....	18
2.3. Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS)	19
2.3. Συνέπειες της παραγωγής ελευθέρων ριζών - Οξειδωτικό στρες.....	19
2.4. Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες.....	21
3. Αντιοξειδωτική Άμυνα των Οργανισμών.....	23
4. Αντιοξειδωτική ουσία.....	23
5. Τρόπος Δράσης Αντιοξειδωτικών	24
5.1. Κατηγορίες Αντιοξειδωτικών.....	24
5.2. Ενδογενή αντιοξειδωτικά.....	24
5.2.1. Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες	25
5.2.2. Μη Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες.....	26
5.3. Εξωγενή αντιοξειδωτικά	28
5.4. Άλλα αντιοξειδωτικά.....	28
6. Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες και οι επιπτώσεις του στην υγεία των ανθρώπων ..	29
7. Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις.....	31
8. Πολυφαινόλες	31
8.1. Χημική Δομή πολυφαινολών	32
8.2. Τάξεις Πολυφαινολών.....	33
8.2.1. Φλαβονοειδή	33
8.2.2. Μη Φλαβονοειδή.....	35
8.3. Φυσιολογικές δράσεις των Πολυφαινολών.....	35

8.4.	Ευεργετικές Επιδράσεις Πολυφαινολών Στην Υγεία	36
8.5.	Αντιοξειδωτική Δράση Πολυφαινολών.....	37
9.	Cichorium Ssp	38
9.1.	Cichorium Intybus	38
9.2.	Cichorium Endivia.....	39
10.	Cichorium spinosum	40
11.	Sonchus asper	42
12.	Σκοπός.....	43
1.	Πληροφορίες για τα εκχυλίσματα εδώδιμων χόρτων.....	44
2.	Μέθοδος Folin–Ciocalteu reagent (FCR)	45
2.1.	Αρχή της μεθόδου	45
2.2.	Πειραματική διαδικασία.....	45
3.	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH• ...	46
3.1.	Αρχή της μεθόδου	46
3.2.	Πειραματική διαδικασία.....	47
3.3.	Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση	48
4.	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•+ ..	48
4.1.	Αρχή της μεθόδου	48
4.2.	Πειραματική διαδικασία.....	50
4.3.	Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση	52
5.	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης (REDUCING POWER).....	53
5.1.	Αρχή της Μεθόδου	53
5.2.	Παρασκευή Διαλυμάτων.....	54
5.3.	Υπολογισμοί	56
6.	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O ₂ ^{•-}	57
6.1.	Αρχή Μεθόδου	57
6.2.	Πειραματική διαδικασία.....	58
7.	Μέθοδοι προσδιορισμού αντιμεταλλαξιγόνου δράσης.	59
	Γενικά	59
8.	Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA	63
8.1.	Αρχή της μεθόδου	63
8.2.	Πειραματική διαδικασία.....	64

9. Εξέταση της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος AREM σε κύτταρα μυοβλαστών ποντικού C2C12.	67
Μυϊκά κύτταρα C2C12.....	67
9.1. Καλλιέργεια των μυοβλαστών ποντικού (σειρά C2C12)	68
9.2. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος με τη μέθοδο ΧΤΤ 70	
9.2.1. Αρχή μεθόδου.....	70
9.3. Κυτταρομετρία Ροής.....	72
10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	75
10.1. Μέθοδος Folin–Ciocalteu reagent.....	75
10.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH•.....	75
10.3. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS•+.....	77
10.4. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη ΜΕΘΟΔΟ REDUCING POWER	78
10.5. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας O ₂ - •.....	80
10.6. Αποτελέσματα της επίδρασης των φυτικών εκχυλισμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από τη ρίζα ROO•.	82
10.7. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του φυτικού εκχυλίσματος AREM με τη μέθοδο ΧΤΤ	84
10.8. Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH με κυτταρομετρία ροής.....	85
10.9. Προσδιορισμός των επιπέδων των ROS με κυτταρομετρία ροής	87
11. Συγκριτικά Διαγράμματα	89
12. Συζήτηση	90
13. Βιβλιογραφική Αναφορά	96

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: Priestley, ο άνθρωπος που ανακάλυψε το οξυγόνο.	14
Εικόνα 2 : Σχηματική αναπαράσταση που δείχνει την απουσία ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου που οδηγεί στο σχηματισμό μιας ελεύθερης ρίζας (free radical).	16
Εικόνα 3 : Δραστικές μορφές οξυγόνου.....	18
Εικόνα 4 : Παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO).	19
Εικόνα 5: Οξειδωτικό στρες.	20
Εικόνα 6: Οι κύριες μορφές οξειδωτικής επίθεσης που δέχεται το κύτταρο.	22
Εικόνα 7: Τρόπος δράσης ενός αντιοξειδωτικού.	23
Εικόνα 8: Τρόπος δράσεις ενδογενών ενζυμικών αντιοξειδωτικών ουσιών.	26

Εικόνα 9: Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες.....	30
Εικόνα 10 : Οι τέσσερις κύριες κατηγορίες πολυφαινόλων.....	32
Εικόνα 11: Χαρακτηριστική εικόνα του άνθους του <i>Cichorium</i> spp.	38
Εικόνα 12: Οι δύο βασικές ποικιλίες του <i>Cichorium endivia</i> , δεξιά το <i>escarole</i> (<i>Cichorium endivia</i> var. <i>latifolium</i>) και αριστερά το <i>endive</i> (<i>Cichorium endivia</i> var. <i>crispa</i>).....	39
Εικόνα 13: Το <i>Endive</i> είναι ένα χαμηλό αναπτυσσόμενο μικρό φυτό και καλλιεργείται σαν μαρούλι, σε σειρές, ευρείες σειρές ή μπαλώματα	39
Εικόνα 14: Χαρακτηριστική εικόνα του φυτού του <i>Cichorium spinosum</i>	40
Εικόνα 15: Το <i>Cichorium spinosum</i> αναπτύσσεται σε ενδιαιτήματα όπως αυτά της εικόνας με θάλασσα και παράλια, πετρώδεις πλαγιές και αμμώδεις θέσεις.	41
Εικόνα 16: Χαρακτηριστική εικόνα του άνθους του <i>Sonchus asper</i>	42
Εικόνα 17: Η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλιδραζόλιο (DPPH•) ανάγεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλιδραζίνη (DPPH:H).	46
Εικόνα 18: Η οξείδωση του ABTS σε δραστική ρίζα.	49
Εικόνα 19: Η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με την ρίζα ABTS ⁺	49
Εικόνα 20: Σχηματισμός συμπλόκου τριθενούς σιδήρου (Fe ³⁺) με κυανό χρώμα που φωτομετρείται στα 700 nm.	53
Εικόνα 21: Σχηματισμός του προϊόντος φορμαζάνη από τη ρίζα σουπεροξειδίου (O ₂ [•]) μέσω του συστήματος μεθοσουλφονική φαιναζίνη (PMS)-νικοτιναμίδιο αδενινονουκλεοτίδιο (NADH).	57
Εικόνα 22: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA.....	60
Εικόνα 23: Χημική δομή της ένωσης AAPH και η αντίδραση της θερμικής της διάσπασης και του σχηματισμού των ριζών ROO•.	63
Εικόνα 24: Συσκευές ανάδευσης vortex και στροβιλισμού spin.	65
Εικόνα 25: Συσκευές και διάταξη ηλεκτροφόρησης και Σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech.	66
Εικόνα 26: C2C12 κύτταρα σε οπτικό μικροσκόπιο.	68
Εικόνα 27: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα.	70
Εικόνα 28: Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.....	73
Εικόνα 29: Το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής από την Becton-Dickinson.....	74

Περιεχόμενο Πινάκων

Πίνακας 1: Πληροφορίες για τα 4 εκχυλίσματα εδώδιμων χόρτων <i>Cichorium</i> spp. <i>Cichorium endivis</i> (AREM), <i>Cichorium intybus</i> (KAEM), <i>Cichorium spinosum</i> (CSEM) και <i>Sonchus Asper</i> (SOC_1) όπως μας στάλθηκαν από το εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυτικών Προϊόντων, της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.	44
Πίνακας 2: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων (Μέθοδος Folin–Ciocalteu reagent (FCR)).....	45
Πίνακας 3: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων.	47
Πίνακας 4: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη.	47
Πίνακας 5: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων.....	51
Πίνακας 6: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη.....	51

Πίνακας 7: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων. (Μέθοδος REDUCING POWER)	55
Πίνακας 8: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων αυτή τη φορά χωρίς την παρουσία του σιδηροκυανιούχου καλίου. (Μέθοδος REDUCING POWER)	56
Πίνακας 9: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων. (Μέθοδος εξουδετέρωσης της ρίζας O ₂ - •)	58
Πίνακας 10: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων χωρίς την προσθήκη PMS . (Μέθοδος εξουδετέρωσης της ρίζας O ₂ - •)	59
Πίνακας 11: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων. (Μέθοδος πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA μέσω σχηματισμού των ριζών ROO•)	65
Πίνακας 12: Αποτελέσματα της μεθόδου Folin–Ciocalteu reagent , η φαινολική περιεκτικότητα είναι εκφρασμένη σε mg/ml.....	75

Περιεχόμενα Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το εκχύλισμα Soc_1.

Διάγραμμα 2: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το εκχύλισμα AREM.

Διάγραμμα 3 : Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το εκχύλισμα KAEM.

Διάγραμμα 4 : Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το εκχύλισμα CSEM.

Διάγραμμα 5: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS•+ από το εκχύλισμα του Soc_1.

Διάγραμμα 6: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS•+ από το εκχύλισμα του AREM.

Διάγραμμα 7: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS•+ από το εκχύλισμα του KAEM

Διάγραμμα 8: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS•+ από το εκχύλισμα του CSEM.

Διάγραμμα 9: Η αναγωγική δύναμη από το εκχύλισμα του Soc_1.

Διάγραμμα 10: Η αναγωγική δύναμη από το εκχύλισμα του AREM

Διάγραμμα 11: Η αναγωγική δύναμη από το εκχύλισμα του KAEM.

Διάγραμμα 12: Η αναγωγική δύναμη από το εκχύλισμα του CSEM.

Διάγραμμα 13: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας O₂- • από το εκχύλισμα Soc_1

Διάγραμμα 14: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας O₂- • από το εκχύλισμα

AREM.

Διάγραμμα 15: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας O₂- • από το εκχύλισμα KAEM.

Διάγραμμα 16: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας O₂- • από το εκχύλισμα CSEM.

Διάγραμμα 17: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ROO• από το εκχύλισμα Soc_1

Διάγραμμα 18: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ROO• από το εκχύλισμα AREM

Διάγραμμα 19: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ROO• από το εκχύλισμα KAEM

Διάγραμμα 20: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ROO• από το εκχύλισμα CSEM.

Διάγραμμα 21: Αποτελέσματα από τη μέθοδο XTT.

Διάγραμμα 22: Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής στα μυϊκά κύτταρα C2C12 για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης (GSH). (Α) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων και (Β) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με τον φθορισμό τους (10.000 κύτταρα).

Διάγραμμα 23: Αποτελέσματα από τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής για τα επίπεδα GSH. Στο διάγραμμα τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως επίπεδα της GSH σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις του φυτικού εκχυλίσματος AREM (μg/ml).

Διάγραμμα 24: Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής στα μυϊκά κύτταρα C2C12 για τον προσδιορισμό των ελευθέρων ριζών (ROS). (Α) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων και (Β) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με τον φθορισμό τους (10.000 κύτταρα).

Διάγραμμα 25: Αποτελέσματα από τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής για τα επίπεδα ROS. Στο διάγραμμα τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως επίπεδα των ROS σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις του φυτικού εκχυλίσματος AREM (μg/ml).

Διάγραμμα 26: Στον διάγραμμα φαίνονται συγκριτικά τα αποτελέσματα, και από τα 4 φυτικά εκχυλίσματα, όσον αφορά τη δραστηριότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών (DPPH •, ABTS •+, O₂ •), την ικανότητα αναγωγής του τρισθενή σιδήρου και της μεθόδου Folin-Ciocalteu.

Διάγραμμα 27: Στον διάγραμμα φαίνονται συγκριτικά τα αποτελέσματα, και από τα 4 φυτικά εκχυλίσματα, όσον αφορά την ικανότητα τους να αναστέλουν την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από τη ρίζα ROO•.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, ένας ολοένα αυξανόμενος ρυθμός εμφάνισης χρόνιων ασθενειών όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές νόσοι και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες έχει αναγκάσει και κινητοποιήσει ένα μεγάλο αριθμό ατόμων να υιοθετήσει έναν διαφορετικό τρόπο ζωής, τόσο ως μέσο πρόληψης όσο και ως μέσο αντιμετώπισης της πρόωρης γήρανσης και γενικότερα ως μέσο βελτιστοποίησης της υγείας τους. Έτσι άρχισε η αναζήτηση προϊόντων τα οποία, εκτός των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους, να έχουν και ευεργετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία.

Σημαντικές ενδείξεις ότι η αυξημένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών μειώνει τη συχνότητα εμφάνισης των προαναφερθέντων ασθενειών έχουν αναφερθεί σε πλήθος μελετών. Ο σύγχρονος τρόπος ζωής κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας έχει μετατοπίσει τις ανάγκες των καταναλωτών προς έτοιμα για κατανάλωση τρόφιμα κάτι που ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για τη μείωση της κατανάλωσης άγριων βρώσιμων χόρτων. Ωστόσο, σήμερα υπάρχει μια αυξανόμενη τάση για κατανάλωση «υγιεινών» ή «σούπερ τροφίμων» που δημιούργησαν μια θέση αγοράς για την εμπορική καλλιέργεια άγριων βρώσιμων χόρτων. Αυτός είναι και ο βασικός λόγος που πολλά από αυτά τα άγρια βρώσιμα χόρτα έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης σε πολλά εργαστήρια και βιομηχανίες που εντείνουν την έρευνα και παραγωγή τέτοιων καινοτόμων προϊόντων. Η μελέτη τέτοιων φυτικών προϊόντων, έδειξε την ύπαρξη φυσικών βιοδραστικών μορίων όπως οι πολυφαινόλες. Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μια κατηγορία μορίων, στα οποία έχουν αποδοθεί πολλές σημαντικές βιολογικές ιδιότητες, με τη σημαντικότερη να είναι η ικανότητά τους να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες, να δρουν δηλαδή ως αντιοξειδωτικοί και χημειο-προστατευτικοί παράγοντες, προστατεύοντας τον οργανισμό από τις συνέπειες του οξειδωτικού στρες.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η εκτίμηση της πιθανής αντιοξειδωτικής και χημειο-προστατευτικής δράσης σε 4 εκχυλίσματα άγριων βρώσιμων φυτών, *Cichorium Endivis*, *Cichorium Intybus*, *Cichorium Spinosum* και *Sonchus Asper* (AREM, KAEM, CSEM, Soc_1 αντίστοιχα). Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις in vitro μέθοδοι. Οι τρεις πρώτες από αυτές στηρίζονται στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH•, ABTS⁺⁺ και της ρίζας υπεροξειδίου (O₂—•) από τις πολυφαινολικές ενώσεις των φυτικών εκχυλισμάτων. Η τέταρτη μέθοδος, η μέθοδος αναγωγής του Fe⁺³ (Reducing Power Assay), αφορά την ικανότητα αυτών των εκχυλισμάτων να ανάγουν τα οξειδωμένα μόρια, που παράγονται κατά την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Ακολούθησε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να προστατεύουν το DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων, που

οφείλονται στη δράση ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα της ρίζας ROO•. Από τις μετρήσεις που έγιναν προέκυψε ότι και τα 4 φυτικά εκχυλίσματα παρουσίασαν τόσοικανότητα εξουδετέρωσης των παραπάνω ριζών όσο και αναγωγική δράση, ενώ την ισχυρότερη ικανότητα παρουσίασε το φυτικό εκχύλισμα AREM. Οι διαφορές στη δραστικότητα των εκχυλισμάτων οφείλονται στο διαφορετικό συνδυασμό και τρόπο δράσης των πολυφαινολών που περιέχονται σε αυτά.

Στο AREM εκχύλισμα που παρουσίασε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω μελέτες. Μελετήθηκαν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του AREM σε μυοβλάστες ποντικού (σε κυτταρική σειρά C2C12). Αρχικά προσδιορίστηκε η κυτταροτοξική συγκέντρωση του AREM με τη μέθοδο ΧΤΤ και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν είχε τοξική δράση σε καμιά από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$). Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) και των ελευθέρων ριζών (ROS) με κυτταρομετρία ροής. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στα κύτταρα που τους χορηγήθηκε το φυτικό εκχύλισμα, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης σε σχέση με κύτταρα control, ενώ δεν παρατηρήθηκαν καθόλου στατιστικά σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα των ROS.

Κατά συνέπεια και με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, προτείνεται η ανάκτηση, με χρήση σύγχρονων και ασφαλών για την ανθρώπινη υγεία μεθόδων, των φυτικών πολυφαινολών που περιέχονται σε μεγάλες ποσότητες στα εκχυλίσματα άγριων βρώσιμων φυτών, και η χρήση τους είτε για την ενίσχυση άλλων τροφών είτε για την δημιουργία νέων προϊόντων (συμπληρώματα διατροφής κ.α.).

SUMMARY

In recent years, an increasing frequency of chronic illnesses such as cancer, cardiovascular disease and neurodegenerative diseases has forced and mobilized a large number of people to adopt a different lifestyle both as a means of prevention and as a means of tackling premature aging and generally as a means of improving their health. This has led to the search for products which, in addition to their nutritional properties, have a beneficial effect on human health.

Significant evidence that increased consumption of fruit and vegetables reduces the incidence of the above-mentioned diseases has been reported in a number of studies. The modern lifestyle over the last decade has shifted consumers' needs to ready-to-eat foods, which are largely responsible for reducing the consumption of wild edible grasses. However, today there is an increasing tendency for consumption of "healthy" or "super foods" that created a market place for the commercial cultivation of wild edible grasses. This is the main reason why many of these wild edible grasses have been studied in many laboratories and industries that intensify the research and production of such innovative products. The bioactivities of such plant products are attributed mainly to polyphenols. The most important property of polyphenols is to act as antioxidants, protecting the body from the effects of oxidative stress.

The aim of this study was to evaluate the possible antioxidant activity of 4 extracts from wild edible plants, *Cichorium endivis*, *Cichorium intybus*, *Cichorium spinosum* and *Sonchus Asper* (AREM, KAEM, CSEM, Soc_1 respectively). In total, four in vitro methods were used. The first three were based on the scavenging of DPPH •, ABTS⁺ stable chemical radicals and the peroxide radical (O₂^{-•}) from the polyphenolic compounds of plant extracts. The fourth method, Fe⁺³ (Reducing Power Assay), relates to the ability of these extracts to act as reducing agents. The results showed that all 4 plant extracts had both free radical scavenging and reducing activity. Moreover, it was examined the ability of the extracts to protect plasmid DNA from free radical-induced damage. The strongest ability was shown by AREM. The differences observed between the different extract were due to their different polyphenolic content.

The antioxidant properties of AREM were also examined in mouse myoblasts (cell line C2C12). Initially, the cytotoxic concentration of AREM was determined by the XTT method and the results showed that there was not cytotoxicity at the concentrations of 1, 5, 10, 25, 50, 100 and 200 µg/ml. Then, it was assessed the effects of the extract on the levels of glutathione (GSH) and free radicals (ROS) by flow cytometry. According to the results, increased levels of glutathione were observed in the cells treated with the plant extract compared to control cells, but no statistically significant changes in ROS levels were observed.

Consequently, the results of the present study suggested the recovery of polyphenols contained in wild edible plants using modern and safe methods for developing biofunctional foods with antioxidant properties and antioxidant food supplements.

1. Εισαγωγή

Το 1775 ο Priestley, ο άνθρωπος που ανακάλυψε το οξυγόνο, ανέφερε ότι «η συνεχής έκθεση στο οξυγόνο μπορεί να σβήσει το κερί της ζωής πολύ γρήγορα». Αυτή η διαπίστωσή του, έδωσε το έναυσμα για τη λύση ενός από τα σημαντικότερα προβλήματα της σύγχρονης επιστήμης: του «παράδοξου του οξυγόνου».



Εικόνα 1: Priestley, ο άνθρωπος που ανακάλυψε το οξυγόνο.

Τα αίτια όμως που καθιστούσαν το οξυγόνο τοξικό με δηλητηριώδεις ιδιότητες ήταν άγνωστα, μέχρι το 1954 που σύμφωνα με τη θεωρία του Gersham, η τοξικότητα του οξυγόνου οφειλόταν σε μερικώς αναχθείσες μορφές οξυγόνου. Δύο χρόνια μετά, το 1956, ο Denham Harman πρότεινε την ιδέα για την ύπαρξη της «ελεύθερης ρίζας» και υποστήριξε ότι αυτά τα συστατικά έχουν βασικό ρόλο στην γήρανση μέσω των πρόκλησης διασταυρωμένων αντιδράσεων και δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών τροποποιώντας λιπίδια, πρωτεΐνες, κυτταρικό DNA (ιδιαίτερα το μιτοχονδριακό DNA) και προκαλώντας μεταλλαξιγενέσεις, καρκίνο και κυτταρική βλάβη.

Μια νέα εποχή για τη διερεύνηση των δράσεων των ελευθέρων ριζών στους ζώντες οργανισμούς αποτέλεσε η ανακάλυψη του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) που έγινε το 1969. Καθώς οι έρευνες σχετικά με τις δράσεις των ελευθέρων ριζών συνεχίζονταν, το 1977 εμφανίστηκαν οι πρώτες αναφορές που περιέγραφαν τις ευεργετικές βιολογικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Αυτές αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και παίζουν διπλό ρόλο: άλλοτε

είναι βλαπτικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς και άλλοτε ευεργετικές (Marian Valko et al., 2007).

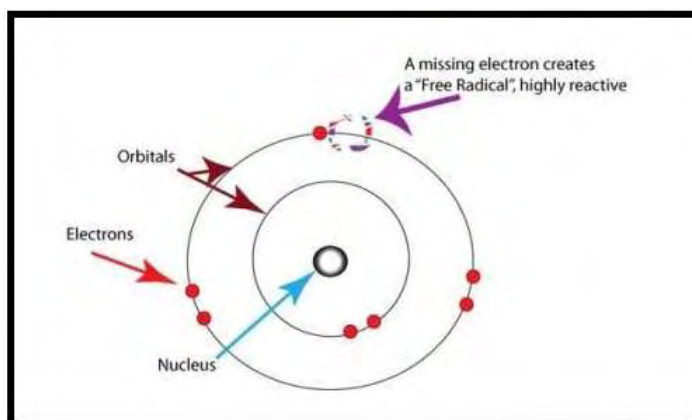
Οι ευεργετικές ιδιότητες των ελευθέρων ριζών φαίνονται από το γεγονός ότι συμμετέχουν σε διαδικασίες σημαντικές για τη λειτουργία του οργανισμού όπως για παράδειγμα στην άμυνα του οργανισμού απομακρύνοντας αντιγόνα με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, στη σηματοδότηση των κυττάρων αλλά και τη μυϊκή συστολή. Άρα συμπεραίνουμε ότι οι ελεύθερες ρίζες δεν είναι μόνο επιβλαβής για τον οργανισμό αλλά τον βοηθούν και στην ομαλή λειτουργία του (Mennen, Walker, Bennetau-Pelissero, & Scalbert, 2005). Είναι πλέον σαφές ότι οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν προσαρμοστεί στη συνύπαρξη με τις ελεύθερες ρίζες και έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς για τη χρησιμοποίηση αυτών σε φυσιολογικές λειτουργίες.

Μέρα με τη μέρα οι ερευνητές έρχονται όλο και πιο κοντά στην κατανόηση των επιβλαβών δράσεων των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, αλλά και στην επίλυση αυτών με τη μελέτη των αντιοξειδωτικών συστατικών του οργανισμού και των τροφίμων, τα οποία παρουσιάζουν σημαντική προστατευτική δράση. Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας μεγαλώνει συνεχώς αφού πολλές μελέτες δείχνουν συσχέτιση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου με την παθογένεση πολλών ασθενειών.

2. Ελεύθερες Ρίζες

Είναι γνωστό ότι τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια, τα οποία περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα και είναι διευθετημένα σε έναν αριθμό τροχιακών που βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις από τον πυρήνα. Στα περισσότερα μόρια, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό, ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο και έτσι τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό εμφανίζοντας μικρότερη ενεργειακή κατάσταση, με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο δραστικό. Όταν όμως ένα ή και περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, τότε το μόριο γίνεται ασταθές και εμφανίζει μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση, με αποτέλεσμα να είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια. Άτομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια

ονομάζονται παραμαγνητικά, ενώ όταν τα άτομα ή μόρια δεν διαθέτουν τέτοια ασύζευκτα ηλεκτρόνια, ονομάζονται διαμαγνητικά. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει την ικανότητα να ελκύει ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων. Αυτές αντιδράσεις ονομάζονται οξειδοαναγωγικές (redox), εκ των οποίων κατά την οξείδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή έχουμε απόκτηση ηλεκτρονίων από ένα άτομο(π.χ. οξειδωτική φωσφορυλίωση, κύκλος του κιτρικού οξέος).



Εικόνα 2 : Σχηματική αναπαράσταση που δείχνει την απουσία ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου που οδηγεί στο σχηματισμό μιας ελεύθερης ρίζα (free radical).

Άρα σύμφωνα με τα παραπάνω ως Ελεύθερη ρίζα (free radical), ορίζεται κάθε είδος ατόμου (όπως οξυγόνο ή άζωτο), μορίου ή ιόντος που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, στην εξωτερική του στιβάδα, το οποίο είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Halliwell & Gutteridge, 1990) (Gilbert, 2000).

Για παράδειγμα όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός, ένα ηλεκτρόνιο παραμένει με κάθε νεο-σχηματισμένη χημική οντότητα με αποτέλεσμα να σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες που είναι πολύ δραστικές, λόγω της παρουσίας των ασύζευκτων ηλεκτρονίων. Αυτά τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια τείνουν να "αποσπώσουν" ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια, έτσι όταν συμβεί αυτό, το μόριο που έχασε το ηλεκτρόνιό του μετατρέπεται σε νέα ρίζα η οποία με τη σειρά της "αποσπά" ηλεκτρόνιο με αντιπαράλληλη στροφορμή (spin) από άλλο μόριο κ.ο.κ. Κατά συνέπεια, μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο,

δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης (Halliwell & Gutteridge, 1990). Το υπόβαθρο για τη διεργασία αυτή αποτελεί η εγγενής τάση ατόμων, ιόντων, μορίων και γενικά ενεργειακών συστημάτων, φυσικά και των ριζών, να διατηρούνται στην κατάσταση ελάχιστης ενέργειας (ground state or atomic unexcited state).

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσικού κυτταρικού μεταβολισμού και έχουν διπλό ρόλο αφού ανάλογα με το ρυθμό παραγωγής τους μπορεί να είναι είτε ευεργετικές είτε επιβλαβείς. Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται ακριβώς στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις. Η δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών εξαρτάται από τα μόρια ή τις άλλες ρίζες στο περιβάλλον, καθώς και από τη φύση (π.χ. πολικότητα) του περιβάλλοντος μέσου. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν με τους παρακάτω τρόπους:

1. Απόσπαση ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο: $X \rightarrow e^- + X^\bullet$
2. Λήψη ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο ή άτομο: $Y + e^- \rightarrow Y^\bullet$
3. Ομολυτική σχάση ομοιοπολικού δεσμού: $A:B \rightarrow A^\bullet + B^\bullet$

(Giles & Jacob, 2002).

2.1. Τύποι Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελευθέρων ριζών. Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Pani, Galeotti, & Chiarugi, 2010) (Sengupta, Ghosh, & Bhattacharjee, 2004; World Cancer Research Fund & American Institute for Cancer Research, 2007), το θείο (Battin & Brumaghim, 2009; Pani et al., 2010) ή τον άνθρακα.

Μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα, αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Halliwell, 2001). Συνολικά, όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ) (Cheeseman & Slater, 1993; Gutteridge, 1995) ενώ αντίστοιχα όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν άζωτο ονομάζονται δραστικά είδη αζώτου (ΔΕΑ).

2.2. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS)-(ΔΕΟ)

Οι ROS χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα και είναι πολύ ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής. Όλες έχουν μια κοινή ικανότητα, να αποσπούν ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο στόχο, δηλαδή προκαλούν οξείδωση και για αυτό δρουν ως οξειδωτικά, ενώ οι ίδιες υφίστανται αναγωγή. Αποτελούνται από τα ενδιάμεσα προϊόντα ατελούς αναγωγής του οξυγόνου.

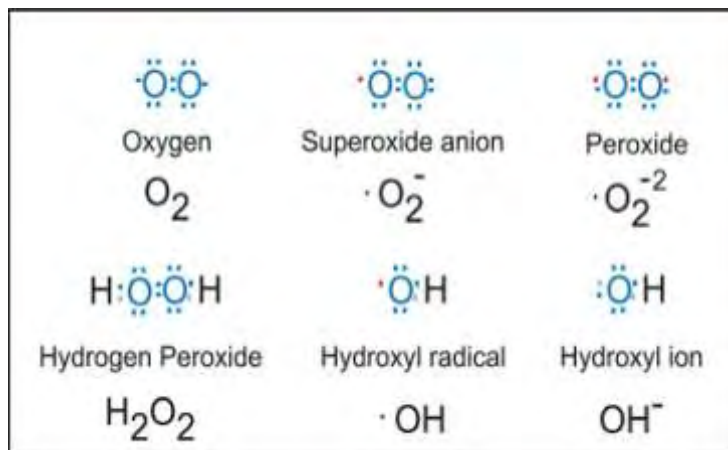
Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου.

Τα κυριότερα ΔΕΟ είναι (Aqil et al., 2012; Vainio, 1999; Weisburger, 2001; World Cancer Research Fund & American Institute for Cancer Research, 2007):

- η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$),
- η ρίζα υδροξυλίου (OH^{\bullet}),
- η ρίζα υπεροξειδίου (ROO^{\bullet}),
- το O_2 μονής κατάστασης ή μονήρες οξυγόνο,
- το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)
- και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$).

Σταδραστικά αυτά μοριακά είδη συμπεριλαμβάνεται επίσης και η δραστική μορφή αζώτου, το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το οποίο είναι ελεύθερη ρίζα.

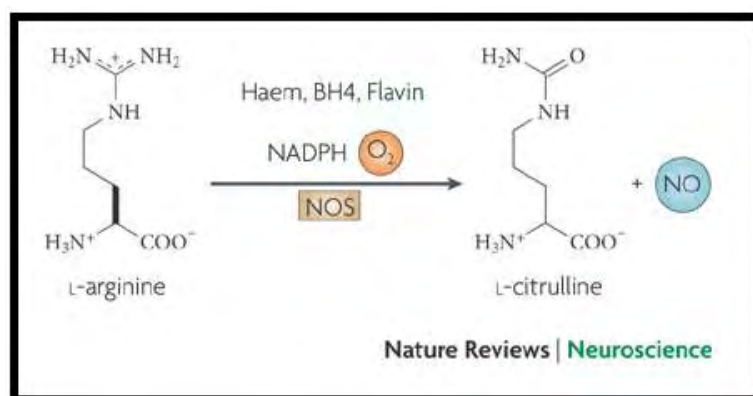
Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, που καταλαμβάνει μόνο του ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό, συμβολίζεται με μία τελεία πάνω και δεξιά ή αριστερά από το χημικό τύπο της ελεύθερης ρίζας, ενώ με (-) συμβολίζεται το αρνητικό φορτίο της ρίζας και με R, ένα άτομο ή μία ομάδα ατόμων, κυρίως αλυσίδα ατόμων άνθρακα.



Εικόνα 3 : : Δραστικές μορφές οξυγόνου.

2.3. Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS)

Τα δραστικά είδη αζώτου (reactive nitrogen species, RNS) αποτελούν μια οικογένεια αντιμικροβιακών παραγόντων που προέρχονται από το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το οποίο παράγεται μέσω της ενζυμικής δραστικότητας της συνθάσης του NO (NOS₂) (Iovine et al., 2008). Έτσι, η κύρια πηγή δραστικών ειδών αζώτου είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO). Όντας και το ίδιο ελεύθερη ρίζα, αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο (O₂), με το υπεροξείδιο (O₂⁻), με την αιμοσφαιρίνη και γενικά με πρωτεΐνες που περιέχουν συναθροίσεις (clusters) ομάδων με δεσμούς δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου με θείο (iron- sulfur centers) καθώς και με άλλες ρίζες πρωτεϊνών και λιπών. Τα παραγόμενα προϊόντα και η τροποποίηση διαφόρων βιομορίων από αυτά, έχουν ουσιαστική συμμετοχή στο μεταβολισμό και στο επίπεδο του οξειδωτικού στρες του οργανισμού (Παπαγαλάνης, 2014).

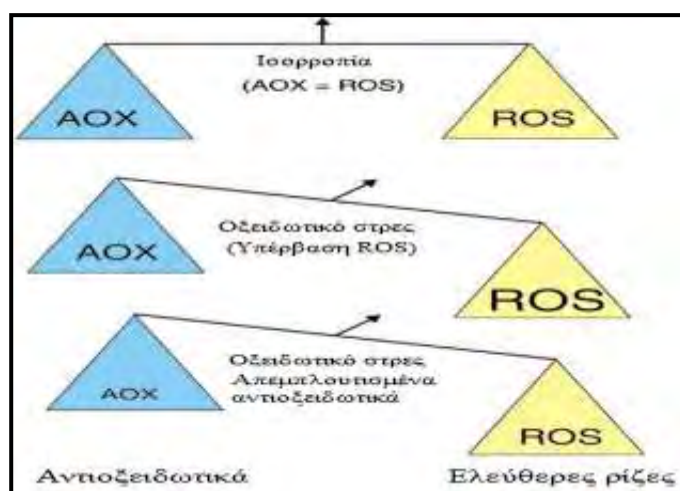


Εικόνα 4 : Παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO).

2.3. Συνέπειες της παραγωγής ελευθέρων ριζών - Οξειδωτικό στρες

Γενικότερα, σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν μια διαταραχή στην ισορροπία προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών προς όφελος των πρώτων, καταλήγοντας σε οξειδωτικές βλάβες (oxidative damage). Αυτή η κατάσταση, ορίζεται ως οξειδωτικό στρες (oxidative stress)(Sies, 1991). Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προ-οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταλήγει σε μια σειρά

δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση.



Εικόνα 5:Οξειδωτικό στρες.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από μείωση της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είτε από αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών αζώτου και οξυγόνου. Στην πρώτη περίπτωση, παρατηρούνται διάφορες μεταλλάξεις και τοξικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, εξάντληση των ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων λόγω πιθανής παθολογικής κατάστασης, καθώς και μείωση των αντιοξειδωτικών ουσιών που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Στη δεύτερη περίπτωση, όπου έχουμε έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS και RNS ή ύπαρξη παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή τους.

Οι πολύ δραστικές ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου μπορούν να προσβάλλουν μεγάλη ποικιλία μορίων όπως σάκχαρα, αμινοξέα, φωσφολιπίδια και γενικά λιπίδια, βάσεις DNA και οργανικά οξέα. Οι λιγότερο δραστικές ελεύθερες ρίζες μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή δραστικότερων καταλήγοντας τελικά στο ίδιο αποτέλεσμα.

Σε κυτταρικό επίπεδο, το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες σε όλα τα μακρομόρια (DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια). Παράλληλα οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου, αλλοιώνοντας έτσι τη

σηματοδότηση, ενώ αν οι βλάβες είναι εκτεταμένες οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, είτε με νέκρωση με απόπτωση.

→μέσω της νέκρωσης, όπου το κύτταρο διογκώνεται και διαρρηγνύεται απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του στο περιβάλλον επηρεάζοντας και τα γειτονικά κύτταρα

→μέσω της απόπτωσης, όπου τα κύτταρα δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και δεν προκαλούν βλάβες στα γειτονικά κύτταρα.

2.4. Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες

Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες επιδρούν αρνητικά σε βιομόρια όπως τα παρακάτω:

Λιπίδια: Όλες οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ευάλωτες σε οξείδωση εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων συμβαίνει σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την επίθεση της ελεύθερης ρίζας, η οποία αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο.

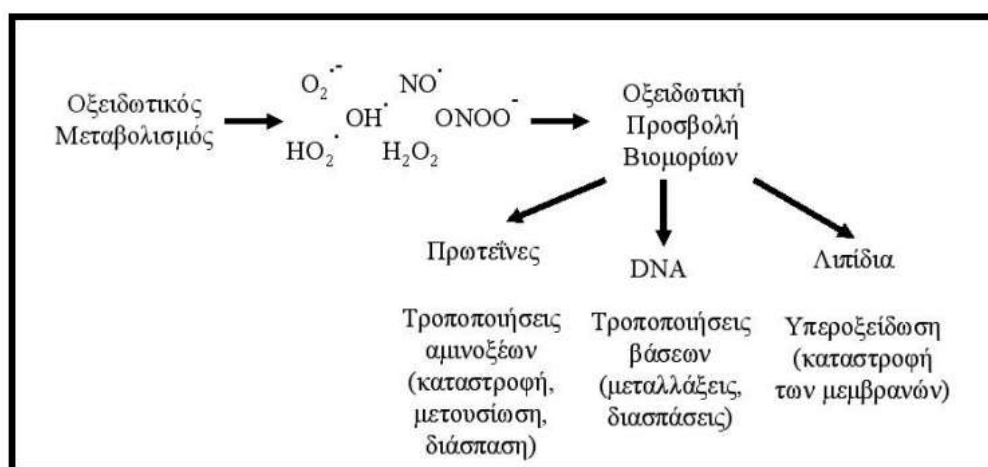
Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει $\text{ROO}\cdot$ κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες-επαναδιευθέτησης και αλληλεπίδρασης με οξυγόνο (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Πρωτεΐνες: Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το $\text{OH}\cdot$, το $\text{RO}\cdot$ και οι ενεργές ρίζες αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι πρωτεΐνες με άμεση και έμμεση καταστροφή από τις ROS υφίστανται αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, εκφυλισμό και τελικά καταστροφή. Οι επιπτώσεις αυτής της καταστροφής είναι η απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, οι αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και οι αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών

(Davis, 1987; Grune et al., 1997; Halliwell and Gutteridge, 1999; Levine et al., 2000; Stadtman, 1986).

DNA: Παρόλο που το DNA είναι σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο, οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν καταστροφές όπως η τροποποίηση των βάσεων, οι θραύσεις του DNA, η απώλεια πουρινών, η ζημιά στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και η βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Για παράδειγμα η ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) προσβάλλει τη γουανίνη στη θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν, την 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις όπως η αδενίνη για να σχηματίσουν την 8-υδροξαδενίνη. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων παρεμφερών προϊόντων (Beckman & Koppenol, 1996; Dizdaroglu, Jaruga, Birincioglu, & Rodriguez, 2002; Halliwell, 2001) (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες εξαρτώνται από την έκταση των μεταβολών που συμβαίνουν και το κύτταρο είναι ικανό να ανακτήσει την αρχική του κατάσταση μετά από περιορισμένη οξειδωτική βλάβη.



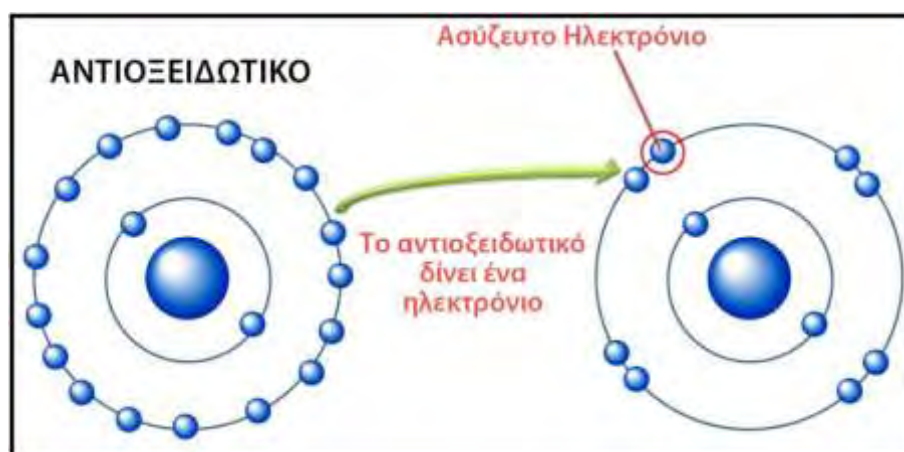
Εικόνα 6: Οι κύριες μορφές οξειδωτικής επίθεσης που δέχεται το κύτταρο.

3. Αντιοξειδωτική Άμυνα των Οργανισμών

Όπως έγινε σαφές από τα παραπάνω, οι ελεύθερες ρίζες είναι τοξικές για όλους τους οργανισμούς και κυρίως για τους αερόβιους, οι οποίοι έρχονται σε άμεση επαφή με το O₂. Έτσι, η συνεχής έκθεση στις βλαπτικές δράσεις των ελευθέρων ριζών τους οδήγησε στην ανάπτυξη μιας σειράς προστατευτικών μηχανισμών, που αφορούν προληπτικούς μηχανισμούς, μηχανισμούς επιδιόρθωσης, μέτρα προστασίας και σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Ειδικότερα, οι οργανισμοί που διαθέτουν δυνατότητα κίνησης μπορούν έμμεσα να αποφύγουν το οξειδωτικό στρες, αποφεύγοντας περιοχές υψηλής πίεσης O₂, όπως έχει παρατηρηθεί στα βακτήρια, ενώ στους πολυκύτταρους οργανισμούς έχουν αναπτυχθεί αποδοτικοί τρόποι μεταφοράς και τροφοδότησης των ιστών με οξυγόνο διατηρώντας όσο το δυνατόν τα επίπεδα του χαμηλά. Εκτός όμως από αυτούς, έχουν εξελιχθεί ειδικότεροι κυτταρικοί βιοχημικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας που αντισταθμίζουν άμεσα την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

4. Αντιοξειδωτική ουσία

Οποιαδήποτε ουσία, η οποία, όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων ορίζετε ως αντιοξειδωτική ουσία (Krinsky, 2002)(Kaplan et al., 2001).



Εικόνα 7: Τρόπος δράσης ενός αντιοξειδωτικού.

Για την εξάλειψη του οξειδωτικού στρες είναι απαραίτητη η ύπαρξη αντιοξειδωτικών μηχανισμών από τον οργανισμό. Ο οργανισμός μας είναι εφοδιασμένος με αντιοξειδωτικά συστήματα από τη φύση του για να αμύνεται στη δράση των ελευθέρων ριζών και των δραστικών μορφών οξυγόνου.

5. Τρόπος Δράσης Αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους:

1. Εμποδίζουν το σχηματισμό ΔΕΟ.
2. Συμβάλουν στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης.
3. Καθυστερούν ή σταματούν τις οξειδωτικές διαδικασίες αφότου αρχίσουν, δηλαδή τη διάδοση των ελεύθερων ριζών μέσω των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Αυτό γίνεται με τη σάρωση και την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών τελικά.
4. Απενεργοποιούν τα μέταλλα μέσω της σύνδεσής τους με αυτά και έτσι δεν τα αφήνουν να δράσουν (μέταλλο-δεσμευτικές πρωτεΐνες).
5. Δρουν συνεργιστικά. Δηλαδή, η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού.

5.1. Κατηγορίες Αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες:

1. Αντιοξειδωτικά ένζυμα
2. Αντιοξειδωτικά μέταλλα
3. Αντιοξειδωτικά από τρόφιμα

Η βασική όμως διάκριση των αντιοξειδωτικών γίνεται με βάση την προέλευσή τους (εξωγενή ή ενδογενή), τη διαλυτότητά τους (υδρόφιλα ή λιπόφιλα) και τη χημική τους φύση (ενζυμική ή μη ενζυμική).

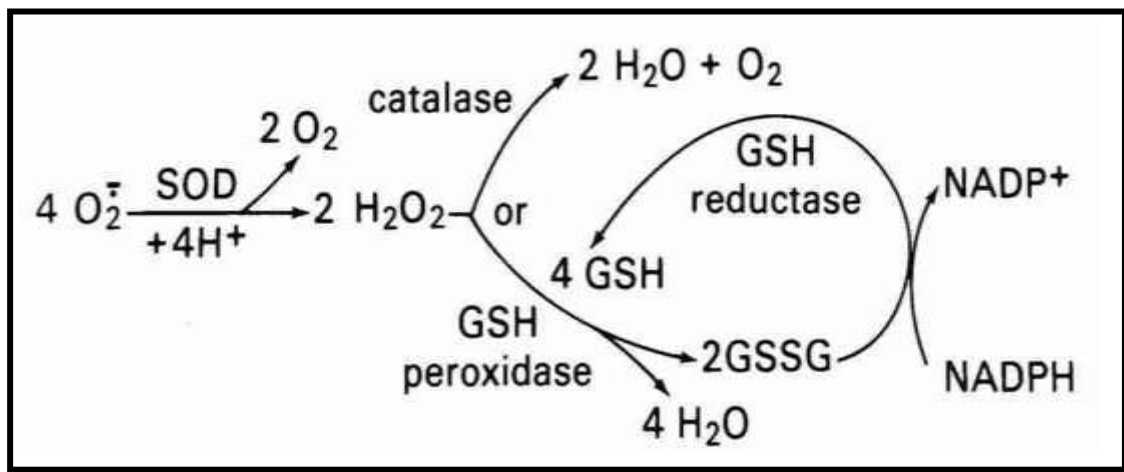
5.2. Ενδογενή αντιοξειδωτικά

Ενδογενή αντιοξειδωτικά, αυτά που τα παράγει από μόνος του ο οργανισμός, ταξινομούνται κυρίως σε ενζυμικά και μη ενζυμικά

5.2.1. Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες

υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	= μετατρέπει το $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 και οξυγόνο. Το $O_2^{\bullet-}$ παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD), ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD (Cu - SOD), η οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα. Υπάρχουν διάφορες μορφές SOD στα βιολογικά συστήματα όπως η Cu, Zn-SOD στο εξωκυττάριο υγρό και η Fe-SOD στα βακτήρια και τα φυτά
καταλάση	= μετατρέπει το H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο. Η καταλάση (CAT) εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα
τρανσφεράση-Στης γλουταθειόνης	= είναι ένα ένζυμο μεταβολισμού φάσης II, το οποίο καταλύει τη σύζευξη της GSH με κάποιο ξενοβιοτικό υπόστρωμα με σκοπό την αποτοξίνωσή του
ρεδουκτάση της γλουταθειόνης	= καταλύει την αναγωγή της γλουταθειόνης, δηλαδή μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή της (GSH)
υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	= μειώνει την λιπιδική υπεροξειδίωση και καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O και O_2 χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη, η οποία οξειδώνεται. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) είναι ένα ένζυμο που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά και τον εξωκυττάριο χώρο και είναι άφθονο στην καρδιά, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο (Antunes, Han, & Cadenas, 2002)

Σχετικά με τα ένζυμα που αναφέρθηκαν προηγουμένως, αυτά έχουν άμεση επίδραση μεταξύ τους. Οι δράσεις τους φαίνονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα (M Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006) (M. Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006).



Εικόνα 8: Τρόπος δράσεις ενδογενών ενζυμικών αντιοξειδωτικών ουσιών.

5.2.2. Μη Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες

Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, κατανέμονται ισότιμα μέσα σε ένα ζωντανό οργανισμό.

Στο εξωκυττάριο τμήμα, και συγκεκριμένα στο πλάσμα, όλα τα στοιχεία που είναι ικανά να δώσουν άτομα υδρογόνου ή ηλεκτρόνια για να ικανοποιήσουν την ανάγκη των ελεύθερων ριζών, αποτελούν κομμάτι του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Σε αυτό περιλαμβάνονται η λευκωματίνη, η χολερυθρίνη και το ουρικό οξύ.

Λευκωματίνη	=ονομάζεται και αλβουμίνη και αναφέρεται γενικότερα σε οποιαδήποτε υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη που βρίσκεται στο αίμα και παράγεται από το συκώτι. Η λευκωματίνη επιτρέπει, μεταξύ άλλων, τη διατήρηση της οσμωτικής πίεσης που απαιτείται για τη διανομή των σωματικών υγρών μεταξύ των ενδοαγγειακών τμημάτων και των ιστών του σώματος.
χολερυθρίνη	= αποτελεί προϊόν του καταβολισμού της αίμης που προέρχεται κατά 85% από την αιμοσφαιρίνη αλλά και από καταλάσες και κυττοχρώματα. Η χολερυθρίνη δημιουργείται από την δράση του ενζύμου χολοπράσινη ρεδουκτάση επί της χολοπρασίνης που αποτελεί προϊόν του καταβολισμού της αίμης και είναι μια πράσινη τετραπυρολική χολοχρωστική. Η χολοπρασίνη ρεδουκτάση αφαιρεί το διπλό δεσμό μεταξύ του δεύτερου και του τρίτου πυρρολικού δακτυλίου, στη συνέχεια η χολερυθρίνη οξειδώνεται και μετατρέπεται ξανά σε χολοπρασίνη. Η αέναη αυτή κυκλική διαδικασία, σε συνδυασμό με τη δραστική αντιοξειδωτική λειτουργικότητα της χολερυθρίνης, έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι ο βασικός της ρόλος είναι η αντιοξειδωτική δράση της στα κύτταρα.

Ουρικό οξύ	= Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser, 1988). Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και με αυτό τον τρόπο να τα προστατεύει από τις ROS
-------------------	--

Στο ενδοκυττάριο τμήμα, το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα κατανέμεται ισότιμα στις μεμβράνες και στο κυτταρόπλασμα. Επειδή η πλειοψηφία των ελεύθερων ριζών παράγεται σε τμήματα όπου υπάρχουν λιπίδια, τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά (βιταμίνη E, β-καροτένιο) εντοπίζονται στις μεμβράνες και αποτελούν την πρώτη γραμμή του αμυντικού συστήματος. Στις επόμενες γραμμές του αμυντικού συστήματος ανήκουν η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C, μερικά μέλη του συμπλέγματος βιταμινών B και η γλουταθειόνη (Markoulis, Gourgoulisanis, Moulas, Gerogianni, & Molyvdas, 2006).

γλουταθειόνη	= είναι μία ένωση που κατατάσσεται στην κατηγορία των θειολών. Πρόκειται για ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη και περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα. Είναι ένα υδατοδιαλυτό μόριο, το οποίο συντίθεται στο ήπαρ και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρεται στους ιστούς. Αποτελεί ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό καθώς συμβάλλει στην προστασία από οξειδωτική βλάβη (Scholz RW et al, 1989). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται διαρκώς από την οξειδωμένη (GSSG) προς την ανηγμένη μορφή (GSH) και το αντίστροφο. Η σύνθεσή της ελέγχεται από αυτή την επανατροφοδοτική αναστολή (feedback) του ενζύμου που την συνθέτει (συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης). Η ανηγμένη μορφή είναι αυτή που έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και συναντάται συχνότερα σε σχέση με την οξειδωμένη και συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. (Halliwell & Gutteridge, 1998). Πιο συγκεκριμένα ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη στα κύτταρα χρησιμοποιείται σαν δείκτης της παρουσίας ελεύθερων ριζών, δηλαδή της ύπαρξης οξειδωτικού στρες.
---------------------	--

Η γλουταθειόνη δρα ενάντια του οξειδωτικού στρες απομακρύνοντας τις δραστικές μορφές του οξυγόνου (ROOH , H_2O_2) και τις εξωγενείς ηλεκτρόνιοφιλες (π.χ. κινόνες). Εκτός αυτού, η GSH συμβάλλει στην αναγωγή και άλλων αντιοξειδωτικών του κυττάρου (ασκορβικού οξέος, βιταμίνης E) συμμετέχοντας έτσι στη διατήρηση της ισορροπίας των επιπέδων των συγκεκριμένων βιταμινών (Παπαγεωργίου 2).

5.3. Εξωγενή αντιοξειδωτικά

Επιπρόσθετα, τα πιο συνηθισμένα εξωγενή αντιοξειδωτικά είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E (τοκοφερόλες), η βιταμίνη A, τα φλαβονοειδή, τα φυτοχημικά και ολιγοστοιχεία (π.χ. σελήνιο, χαλκός, ψευδάργυρος, μαγνήσιο) τα οποία μπορούν να χορηγηθούν ως συμπληρώματα διατροφής. Πιο συγκεκριμένα, η βιταμίνη C (ή ασκορβικό οξύ) και η βιταμίνη E είναι δύο ισχυρά αντιοξειδωτικά, τα οποία έχουν συνεργιστική δράση (Khallouki et al., 2003).

βιταμίνη E	= είναι λιποδιαλυτή, αποτελείται από τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες και βρίσκεται κυρίως στα φυτικά έλαια και τους ξηρούς καρπούς. Προστατεύει τα κύτταρα του πνεύμονα που είναι εκτεθειμένα στο οξυγόνο, αποτρέπει την οξείδωση της κακής χοληστερίνης LDL, ανάγει μεταβατικά μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός και ως επί το πλείστον αποτρέπει την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και των πρωτεϊνών και εμποδίζει την δημιουργία οξειδωτικού στρες.
βιταμίνη C	= είναι υδατοδιαλυτή, βρίσκεται κυρίως στα φρούτα και λαχανικά και προστατεύει από την αθηροσκλήρωση, καθώς εμποδίζει την οξείδωση της LDL χοληστερίνης και αυξάνει την ευεργετική χοληστερίνη (HDL). Επίσης, δρα απευθείας με τις ρίζες υδροξυλίου, υπεροξειδίου και το οξυγόνο απλής κατάστασης, ενώ παράλληλα ανάγει την οξειδωμένη μορφή της βιταμίνης E, όταν η τελευταία έχει παγιδέψει μια ελεύθερη ρίζα.

5.4. Άλλα αντιοξειδωτικά

Γενικότερα, άλλες γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι η λακτοφερίνη, η σερουλοπλασμίνη, η απτοσφαιρίνη, η τρανσφερίνη, η αιμογλοβίνη, οι οξειδάσες κυτοχρωμάτων και το συνένζυμο Q10(Markoulis et al., 2006). Σημαντική, επίσης, θεωρείται και η δράση της μελατονίνης.

Μελατονίνη	= παράγεται κυρίως σε συνθήκες απόλυτου σκοταδισμού και είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό που μπορεί εύκολα να διασχίσει τις κυτταρικές μεμβράνες και τον αιματο-εγκεφαλικό φράγμα και εξουδετερώνει άμεσα τις ελεύθερες ρίζες OH, O ₂ - και NO. Έτσι, απαιτείται αρκετός ύπνος, ώστε ο οργανισμός μας να παράξει τα απαραίτητα επίπεδα μελατονίνης και να επωφεληθεί από τον προστατευτικό ρόλο που αυτή ασκεί στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA (Poljsak, 2011).
-------------------	--

Συνένζυμο Q10	= Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την παραγωγή ATP. Έχει επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Halliwell & Gutteridge, 1998).
----------------------	---

6. Διαταραχές Οξειδωτικού Στρες και οι επιπτώσεις του στην υγεία των ανθρώπων

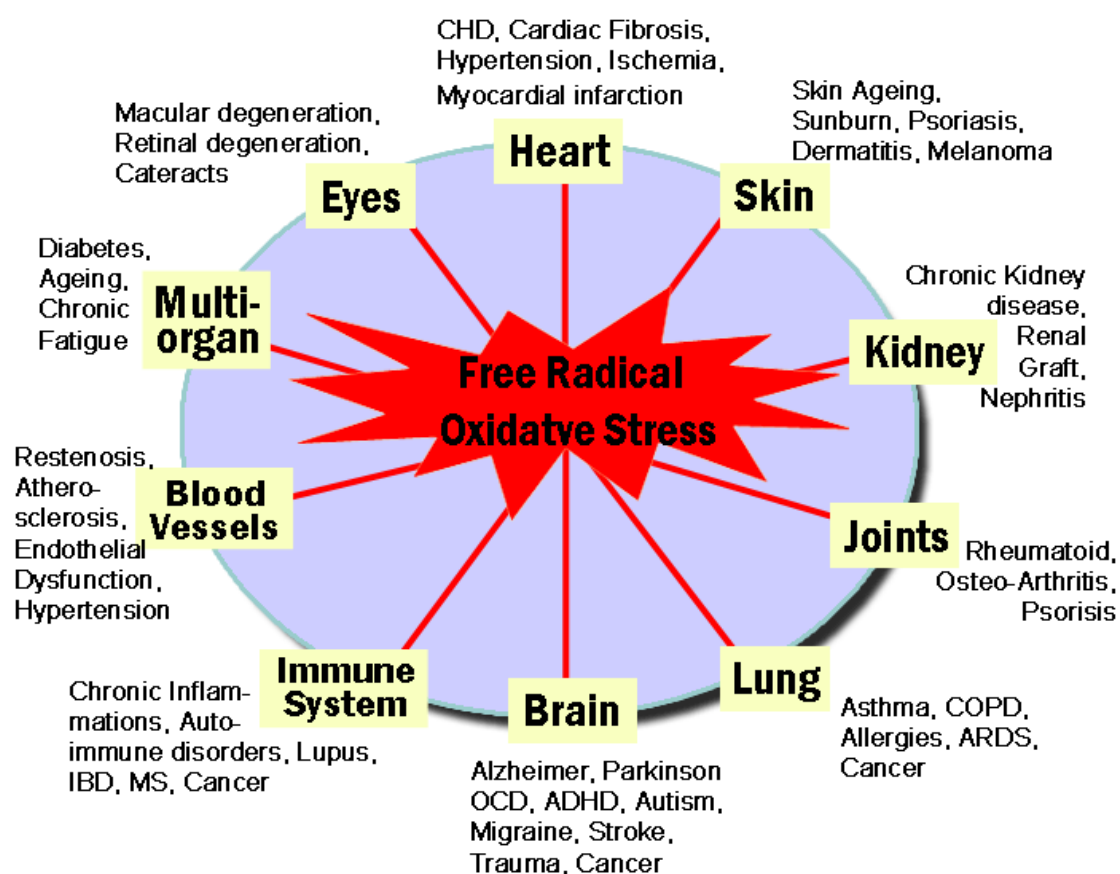
Σε περίπτωση που δημιουργηθεί οξειδωτικό στρες στον οργανισμό, είναι πιθανόν να παρατηρηθούν σημαντικές αλλοιώσεις ή και τροποποιήσεις κυρίως των νουκλεϊκών οξέων (πρόκληση μεταλλάξεων και διαφόρων γενετικών επιπτώσεων), των κυτταρικών μεμβρανών (διακοπή της διακυτταρικής επικοινωνίας), των μιτοχονδρίων (αποσύζευξη ενεργειακής παραγωγής), των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, όπως προαναφέραμε. Ως αποτέλεσμα, μπορεί να προκληθεί αποσύνθεση και θάνατος των κυττάρων και κατ' επέκταση ανάπτυξη πολλών σοβαρών ασθενειών (Pisoschi & Pop, 2015).

Το οξειδωτικό στρες αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της ηλικίας και έτσι αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες της γήρανσης του οργανισμού (Rinnerthaler, Bischof, Streubel, Trost, & Richter, 2015).

Επιπρόσθετα ένα μεγάλο εύρος σημαντικών ασθενειών που φαίνεται να σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες είναι ο καρκίνος, η καρδιαγγειακή νόσος, η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, η ισχαιμική βλάβη, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer, Parkinson) και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Marian Valko et al., 2007). Κάποιες άλλες σχετιζόμενες ασθένειες είναι τα αναπνευστικά προβλήματα, οι δερματικές παθήσεις, η περιβαλλοντική ευαισθησία, η φλεγμονώδης ασθένεια του εντέρου, το χρόνιο σύνδρομο κόπωσης, καθώς και το AIDS ή άλλες παρεμφερείς ασθένειες (Poljsak, 2011).

Διάφορες κλινικές παρατηρήσεις δείχνουν ότι η κυτταρική απόκριση στο οξειδωτικό στρες εκδηλώνεται κατά τη διάρκεια της νόσου και επομένως μπορεί να επηρεάσει ή να τροποποιήσει την πορεία της. Η συσχέτιση μιας νοσολογικής οντότητας με το οξειδωτικό στρες προέρχεται από την παρατήρηση της ύπαρξης αυξημένης ποσότητας προϊόντων αντίδρασης ελευθέρων ριζών, ιδίως δεικτών υπεροξειδωσής λιπιδίων, στα βιολογικά υγρά. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η υπεροξειδωση

αποτελεί δευτερογενές φαινόμενο και συνεπώς δεν υποδηλώνει άμεσο ρόλο του οξειδωτικού στρες στη νόσο. Προκειμένου να αιτιολογηθεί ο πρωτογενής ρόλος του οξειδωτικού στρες σε μια νόσο, πρέπει να υπάρχει ένας εύλογος μηχανισμός, σύμφωνα με τον οποίο να δικαιολογείται αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών ή μείωση των αντιοξειδωτικών εφεδρειών. Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες πρέπει να ανιχνεύεται πριν από την έναρξη της ιστικής βλάβης και η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε πρώιμο στάδιο πρέπει να μπορεί να εμποδίσει ή να μειώσει την ιστική βλάβη. Σύμφωνα με τα ανωτέρω, ο πρωτογενής ρόλος του οξειδωτικού στρες είναι σαφής στη διεργασία της καρκινογένεσης, αλλά αποτελεί αντικείμενο έρευνας για τις άλλες νοσολογικές οντότητες (Of, Medicine, & Harman, 2009) (Ε. Γιαννακοπούλου, 2007).



Εικόνα 9: Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες

7. Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις

Τα τελευταία χρόνια, ένας μεγάλος αριθμός ερευνών έχει προσανατολιστεί στην ανάπτυξη χημειοπροστατευτικών παραγόντων που προέρχονται από τρόφιμα της καθημερινής διατροφής. Σε αυτούς τους παράγοντες ανήκουν και οι βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις. Η χημειοπροστασία ως όρος χρησιμοποιήθηκε πριν 35 χρόνια από τον Lee Wattenberg και είναι η χρήση φυσικών ή συνθετικών ουσιών για την πρόληψη ασθενειών και μολύνσεων (Baliga et al., 2011; Kushi et al., 2012; Schwartz, 2014; Wang, Gao, & Fang, 2012).

Ο όρος βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις αναφέρεται σε ουσίες φυτικής προέλευσης που βρίσκονται στα τρόφιμα και έχουν ιδιότητες που τους προσδίδουν την ικανότητα να δρουν προστατευτικά σε χρόνιες παθήσεις (Camire, 2002) (Bidlack et al. 2000; Meskin et al. 2002). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις, οι οποίες έχουν αποδοθεί στις περιεχόμενες φυτοχημικές ενώσεις (Kris-Etherton et al., 2002; Marian Valko et al., 2007). Οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν τις κυριότερες βιοδραστικές/ φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων και είναι εκείνες οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτενέστερα για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Camire, 2002) (Bidlack et al. 2000).

8. Πολυφαινόλες

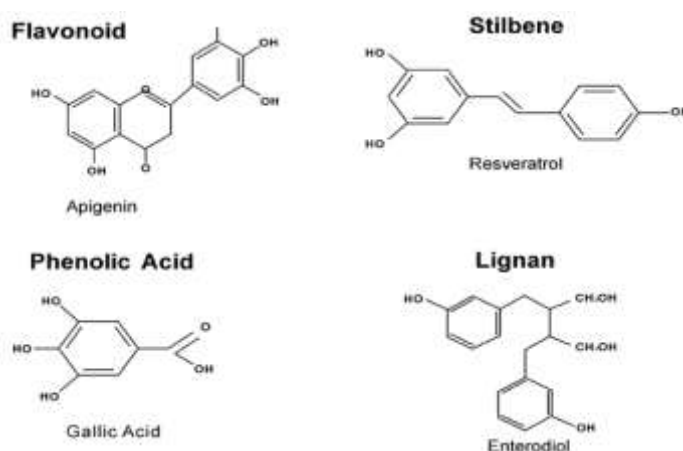
Οι πολυφαινόλες είναι η μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών (φυτικοί μεταβολίτες) και ένα αναπόσπαστο μέρος της δίαιτας των ανθρώπων και των ζώων (Tsao, 2010). Είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται κυρίως από φυσικές, καθώς και συνθετικές ή ημισυνθετικές χημικές ουσίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μεγάλων πολλαπλάσιων δομικών μονάδων της φαινόλης (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Pouysegu, 2011).

Γενικά τρόφιμα που περιέχουν σύνθετα μείγματα πολυφαινολών, σύμφωνα με μια ανασκόπηση του 2005, είναι προϊόντα που καταναλώνονται ευρέως σε μεγάλες ποσότητες, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά, το πράσινο τσάι, το μαύρο τσάι, το κόκκινο κρασί, ο καφές, η σοκολάτα, οι ελιές, τα εσπεριδοειδή, η σόγια και το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. Επίσης, τα βότανα και μπαχαρικά, οι ξηροί καρποί και τα φύκια

είναι επίσης δυνητικά σημαντικά για την παροχή ορισμένων πολυφαινολών (D'Archivio, Filesi, Vari, Scazzocchio, & Masella, 2010). Στην ανθρώπινη διατροφή, θεωρούνται η πιο άφθονη πηγή αντιοξειδωτικών.

8.1. Χημική Δομή Πολυφαινολών

Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο πολυφαινόλες να εννοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Ο χημικός τύπος της φαινόλης (Φαινικό οξύ) είναι C_6H_5OH , το απλούστερο των φαινολών. Περισσότερες από 8.000 πολυφαινολικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί σε διάφορα φυτικά είδη. Όλες οι φυτικές φαινολικές ενώσεις προκύπτουν από ένα κοινό ενδιάμεσο, την φαινυλαλανίνη, ή μια κοντινή πρόδρομη ένωση, το σικιμικό οξύ. Οι πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις, όπως οι ταννίνες. Ανευρίσκονται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τμήμα μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμη και ολιγοσακχαρίτης. Η γλυκοζυλίωση αυξάνει τη διαλυτότητα των πολυφαινολών. Η γλυκόζη είναι ο πιο κοινός εκπρόσωπος των σακχάρων, αν και απαντώνται επίσης γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη, καθώς και γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ. Οι πολυφαινόλες μπορούν επίσης να είναι ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια. Παράλληλα, κατέχουν υψηλή συγγένεια δέσμησης με τις πρωτεΐνες, σχηματίζοντας διαλυτά ή αδιάλυτα σύμπλοκα μαζί τους (Papadopoulou and Frazier 2004).



Εικόνα 10 : Οι τέσσερις κύριες κατηγορίες πολυφαινολών.

8.2. Τάξεις Πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες ταξινομούνται σε διαφορετικές κατηγορίες (Mennen et al., 2005), ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων στη δομή τους, καθώς και τα δομικά στοιχεία και τους υποκαταστάτες που προσδένονται στου δακτυλίου τους. Ως εκ τούτου, προσδιορίζονται δύο κύριες ομάδες: τα φλαβονοειδή και οι μη φλαβονοειδείς ομάδες.

8.3. Φλαβονοειδή

Φλαβονοειδή: Έχουν μια κοινή δομή, που αποτελείται από δύο δακτυλίους, οποίοι ενώνονται μεταξύ τους με 3 άτομα άνθρακα σχηματίζοντας έναν οξυγονωμένο ετερόκυκλο. Έτσι, μπορούν να διακριθούν σε 6 υποκατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του ετερόκυκλου που εμπλέκεται. Αυτές είναι οι: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόλες (κατεχίνες, προανθοκυανιδίνες) (Han, Shen, & Lou, 2007; Manach, Scalbert, Morand, Remesy, & Jimenez, 2004). Υπάρχουν σε κόκκινες, μπλε και μωβ αποχρώσεις και αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων που συναντάμε στην ανθρώπινη διατροφή. Τρόφιμα με υψηλή σύσταση σε φλαβονοειδή θεωρούνται το κόκκινο και πράσινο τσάι, η μαύρη σοκολάτα, τα βατόμουρα, τα κρεμμύδια, ο μαϊντανός, τα εσπεριδοειδή, οι μπανάνες και το κόκκινο κρασί (Harnly et al., 2006). Έρευνες έδειξαν ότι είναι ιδιαίτερα ευεργετικά ενάντια στον καρκίνο, τις φλεγμονές, το οξειδωτικό στρες και τις καρδιαγγειακές νόσους.

Φλαβανόλες: Χαρακτηριστικό παράδειγμα φλαβανολών είναι οι κατεχίνες (μονομερή) και οι προκυανιδίνες (πολυμερή), βρίσκονται σε πολλά φρούτα (π.χ. βερίκοκα και σταφύλια) και στο κρασί αλλά οι σημαντικότερες πηγές είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα. Μάλιστα, κατά τη ζύμωση του πράσινου τσαγιού παράγονται πολύπλοκες πολυφαινόλες όπως είναι οι ταννίνες. Κύρια πηγή των φλαβανολών αποτελούν τα εσπεριδοειδή που περιέχουν την εσπεριδίνη. Στην ίδια κατηγορία πολυφαινολών συναντούμε τη ναριγενίνη και τη ταξιφολίνη.

Φλαβόνες: απαντώνται στο σέλινο (λουτεολίνη) καθώς επίσης και στο κόκκινο γλυκό πιπέρι (απιγενίνη). Ακόμα, στο μαϊντανό, στα δημητριακά (κυρίως σε

γλυκοσυλιωμένη μορφή) και στα εσπεριδοειδή (κυρίως σε πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) (Shahidi and Nacz 1995).

Φλαβονόλες: Η κυριότερη φλαβονόλη είναι η κερκετίνη, κατατάσσονται επίσης, η καμφερόλη, μυρικετίνη, και η φισετίνη. Οι φλαβονόλες βρίσκονται στις περισσότερες φυτικές τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο και οι σημαντικότερες πηγές τους είναι τα κρεμμύδια, τα πράσσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα, το κρασί και το τσάι (Manach et al., 2004).

Φλαβανόνες: βρίσκονται στις τομάτες, σε αρωματικά φυτά όπως η μέντα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή (Tomas-Barberan and Clifford 2000).

Ισοφλαβόνες: βρίσκονται στη σόγια και αντιπροσωπεύονται από τη γενιστεΐνη και τη δαϊντζεΐνη. Η δομή τους είναι παρόμοια με εκείνη των οιστρογόνων. Οι ισοφλαβόνες υποστηρίζεται ότι ασκούν μια καρδιοπροστατευτική δράση. Επίσης συμβάλλουν και στη βελτίωση λειτουργίας του ενδοθελίου. Όμως αυτή η θεωρία απορρέει από περιορισμένες μελέτες. Η πιθανή ευεργετική επίδραση των ισοφλαβονών στον ανθρώπινο οργανισμό δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Εκτός αυτού, έχει την ικανότητα να μειώνει την ενδοθηλιακή σύνθεση και δράση του μονοξειδίου του αζώτου ($\text{NO}\bullet$) (Wendy L. Halli 2005).

Ανθοκυανιδίνες: σε αυτές οφείλεται το κόκκινο και το μπλε χρώμα πολλών φρούτων και λαχανικών (κόκκινο λάχανο, μελιτζάνες, κόκκινα κρεμμύδια, φράουλες) (Clifford 2000). Οι προ-ανθοκυανιδίνες φαίνεται να μειώνουν στον ορό του αίματος, τα επίπεδα της γλυκόζης, της γλυκοζυλιωμένης πρωτεΐνης καθώς και της ουρίας. Επίσης, συμβάλλουν στην καταστολή της παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου ενώ παράλληλα αυξάνουν το λόγο GSH/GSSG. Επιπλέον, επιδρούν στην υπερλιπιδαιμία, μειώνοντας σημαντικά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, της ολικής χοληστερόλης και των μη απαραίτητων λιπαρών οξέων. Οι προανθοκυανιδίνες (και συγκεκριμένα τα oligομερή αυτών) ασκούν προστατευτική δράση έναντι της υπεργλυκαιμίας και της υπερλιπιδαιμίας που παρουσιάζουν οι διαβητικοί ασθενείς (και του διαβήτη τύπου I και τύπου II) και λειτουργούν ως ρυθμιστές σε φλεγμονώδεις καταστάσεις που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες (Takako Yokozama 2012).

8.3.1. Μη Φλαβονοειδή

Μη φλαβονοειδή: Είναι κυρίως τα φαινολικά οξέα, οι λιγνάνες και τα στυλβένια.

φαινολικά οξέα: χωρίζονται σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (7 άτομα άνθρακα) και του κινamikού οξέος (9 άτομα άνθρακα) (Manach et al., 2004) και βρίσκονται κυρίως στα μήλα, τις φράουλες, τα κεράσια, τα ακτινίδια, τα κρεμμύδια, τον καφέ, το τσάι, τα βατόμουρα, τη βρώμη, το κόκκινο κρασί και άλλα. Χαρακτηρίζονται από αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Παραδείγματα φαινολικών οξέων είναι το καφεϊκό οξύ και το γαλλικό οξύ.

λιγνάνες: περιέχονται σε διάφορα δημητριακά, τη σόγια, το βερίκοκο, το μπρόκολο, το λιναρόσπορο και το λάχανο. Μελέτες δείχνουν ότι παίζουν προστατευτικό ρόλο σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, η οστεοπόρωση και η καρδιαγγειακή νόσος, αλλά ακόμα δεν έχουμε σαφή αποτελέσματα (Adlercreutz, 2007).

στυλβένια: έχουν βρεθεί σε μικρές ποσότητες στην διατροφή του ανθρώπου. Το πιο γνωστό στυλβένιο είναι η ρεσβερατρόλη, μια φυταλεξίνη, η οποία οξειδώνεται εύκολα και είναι δύσκολο να παραμείνει καθαρή επί μακρό χρονικό διάστημα. Βρίσκεται κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις στον φλοιό των σταφυλιών και ιδιαίτερα των κόκκινων σταφυλιών, στα φύλλα ευκαλύπτου και ελάτου, στους ξηρούς καρπούς, στα μούρα (Soleas, Diamandis, & Goldberg, 1997). Θεωρούνται ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, δράση κατά του Alzheimer, του καρκίνου, του σακχαρώδους διαβήτη και των καρδιαγγειακών νόσων. Βρίσκεται και σε μικρές ποσότητες στο κόκκινο κρασί (Manach et al., 2004) για αυτό και σχετίζεται άμεσα με το «Γαλλικό παράδοξο».

8.4. Φυσιολογικές δράσεις των Πολυφαινολών

Στα φυτά έχουν βρεθεί περισσότερες από 4000 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις. Θεωρούνται προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Οι πολυφαινόλες είναι ως ένα βαθμό υπεύθυνες για τις οργανοληπτικές και διατροφικές ιδιότητες των φυτικών τροφίμων. Προσδίδουν στα τρόφιμα και στα ποτά την χαρακτηριστική πικρή γεύση και τη στυφότητα. Εμπλέκονται και σε οξειδωτικές μεταβολές οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη επιθυμητών οργανοληπτικών ιδιοτήτων. Εκτός από τις

ιδιότητες που προσδίδουν στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες είναι ιδιαίτερα ωφέλιμες για τον ανθρώπινο οργανισμό, αφού παρέχουν προστασία έναντι των καρδιοπαθειών και ορισμένων μορφών καρκίνου (Hertog et al., 1995).

Επίσης, οι πολυφαινόλες παίζουν σημαντικό ρόλο και στα φυτά καθώς μπορεί να έχουν αρκετές επιπτώσεις στους φυτικούς ιστούς. Οι φυτικές πολυφαινόλες ευθύνονται για την απελευθέρωση και καταστολή των αυξητικών ορμονών (π.χ. αυξίνη), την προστασία ενάντια στην ιονίζουσα ακτινοβολία UV, την παροχή οργανοληπτικών ιδιοτήτων που αποτρέπουν τα φυτοφάγα ζώα στο να τα καταναλώσουν, την πρόληψη από μικροβιακές λοιμώξεις (φυτοαλεξίνες) και τη συμμετοχή σε διαδικασίες ανάπτυξης (Huber, Eberl, Feucht, & Polster, 2003). Επιπλέον, αποτελούν μόρια σηματοδότησης της ωρίμανσης καθώς και άλλων αναπτυξιακών διαδικασιών μέσω της ρύθμισης στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (Lattanzio, Lattanzio, Cardinali, & Amendola, 2006). Στα φρούτα και λαχανικά παρέχουν το φωτεινό χρώμα (φυτικές χρωστικές), το οποίο διευκολύνει τη γονιμοποίηση των φυτών, προσελκύοντας τα έντομα επικονιαστές. Επιπλέον, λειτουργούν ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα που είναι τοξικά για τα φυτά και εμπλέκονται στις διαδικασίες της μορφογένεσης, του καθορισμού του φύλου και της φωτοσύνθεσης (DiCarlo, Mascolo, Izzo, & Capasso, 1999; Manach et al., 2004) (Harborne, 1986). Τέλος, σε ορισμένα είδη φυτών οι πολυφαινόλες μπορούν να παρέχουν προφύλαξη έναντι της σήψης (Hart & Hillis, 1974).

8.5. Ευεργετικές Επιδράσεις Πολυφαινολών Στην Υγεία

Οι πολυφαινόλες θεωρούνται μη θρεπτικά συστατικά, τα οποία όμως παρεμβαίνουν στην απορρόφηση απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, όπως ο σίδηρος και άλλα μεταλλικά ιόντα, και στη δέσμευση πεπτικών ενζύμων και πρωτεϊνών. Οι επιπτώσεις τους στην υγεία εξαρτώνται από το ποσό της πρόσληψής τους και από τη βιοδιαθεσιμότητά τους, η οποία ποικίλλει. Γενικώς, έχουν γίνει πολλές έρευνες σχετικά με τις ενδεχομένες ευεργετικές επιδράσεις τους (Mennen et al., 2005).

Πειραματικές μελέτες σε ζώα ή ανθρώπινα καλλιεργούμενα κύτταρα έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες παίζουν προστατευτικό ρόλο ενάντια στον καρκίνο, τις καρδιαγγειακές νόσους, το διαβήτη, τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και την οστεοπόρωση. Άλλες ευεργετικές επιδράσεις τους όσον αφορά την υγεία του ανθρώπου, είναι η μείωση της

πιθανότητας πρόκλησης ασθενειών της καρδιάς, ηπατικών ασθενειών, παχυσαρκίας, αθηροσκλήρωσης, διαφόρων αλλεργιών και ασθενειών του γαστρεντερικού σωλήνα (Bouayed&Bohn, 2010; Rodrigo, Libuy, Feliu, & Hasson, 2014). Παρακάτω φαίνονται οι ασθένειες με τις οποίες εμπλέκονται οι πολυφαινόλες.

8.6. Αντιοξειδωτική Δράση Πολυφαινολών

Πολλές έρευνες έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες, δίνοντας σε αυτές ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομο υδρογόνου. Μ' αυτόν τον τρόπο, καταστέλλουν την διάδοση των ελεύθερων ριζών η οποία συμβαίνει μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης, μέσω της αναστολής ή απενεργοποίησης των ROS. Πιο συχνά, πολυφαινόλες δρουν:

- ως άμεσοι δευσμευτές ριζών των αλυσιδωτών αντιδράσεων υπεροξειδωσής των λιπιδίων, με αποτέλεσμα να τις σταματούν, ενώ οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε σταθερές ρίζες (λιγότερο δραστικές).
- ως χηλικές ενώσεις, καθώς δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος Fe^{2+} , μειώνοντας το ποσοστό της αντίδρασης Fenton και εμποδίζοντας την οξειδωση που συμβαίνει από τις πολύ δραστικές $\text{OH}\cdot$.
- ως συν-αντιοξειδωτικά, αναγεννώντας βασικές βιταμίνες, αναστέλλοντας την οξειδάση της ξανθίνης, αλλά και αυξάνοντας διάφορα ενδογενή αντιοξειδωτικά, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση.

Από την άλλη πλευρά, όμως, δεδομένου ότι οι ίδιες οι πολυφαινόλες μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες, σε αυξημένες συγκεντρώσεις μπορεί να αποκτήσουν και προ-οξειδωτική ικανότητα, κάτι που φανερώνει ότι η δράση τους είναι δοσο-εξαρτώμενη. Κατά συνέπεια, πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες, ώστε ναδειχθεί η απαιτούμενη δοσολογία πολυφαινολών που χρειάζεται ο οργανισμός και η οποία θα προκαλεί περισσότερο αντιοξειδωτική παρά προ-οξειδωτική δραστηριότητα και θα καθίσταται ευεργετική για τον οργανισμό (Bouayed&Bohn, 2010; Mennenetal., 2005; Tsao, 2010).

1. Cichorium Ssp



Εικόνα 11: Χαρακτηριστική εικόνα του άνθους του *Cichorium ssp.*

Το *Cichorium* είναι ένα γένος φυτών της φυλής των πικραλίδων που ανήκει στην οικογένεια των ηλιόσπορων. Το γένος περιλαμβάνει δύο καλλιεργούμενα είδη που είναι κοινώς γνωστά ως κιχώριο ή έλικα, καθώς και διάφορα άγρια είδη.

1.1. *Cichorium Intybus*

Το πιο κοινό κιχώριο είναι το *Cichorium Intybus*, που είναι ένα θαμνώδες πολυετές βότανο με μπλε (ή πιο σπάνια, λευκά ή ροζ) λουλούδια. Είναι ένα λαχανικό που καλλιεργείται σε μεσογειακές χώρες όπως η Ελλάδα καθώς και εύκρατες περιοχές της Ευρασίας και της Βόρειας Αμερικής (Sinkoví et al., 2015). Είναι ένα ξυλώδες φυτό που έχει πολλά οφέλη για την υγεία, όπως αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντι-μεταλλαξιογόνες, αντι-καρκινογόνες, αντι-τοξικές, αντι-υπεργλυκαιμικές και αντιρευματογενείς ιδιότητες.

Το *Chicory* παρουσιάζει ενδιαφέρον κυρίως για την περιεκτικότητά του σε φυτοχημικά προϊόντα όπως φαινολικά οξέα (Innocenti et al., 2005; Papetti et al., 2006), φλαβονοειδή, κουμαρίνη, κινναμωμικό, κιννοϊκό οξύ και ανθοκυανίνες. Αυτές οι πολυφαινόλες έχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενώ έχει βρεθεί ότι ρυθμίζουν τη δράση ορισμένων ενζύμων, όπως των ενζύμων αποτοξίνωσης φάσης II και των εξαρτώμενων από τη GSH αντιοξειδωτικών ενζύμων. Διαπίστωσαν επίσης ότι το εκχύλισμα φύλλων κιχωρίου είναι μια καλή πηγή φαινολικών ενώσεων που έχουν καλή αναγωγική ισχύ και ικανότητα δέσμευσης ριζών DPPH (Innocenti et al., 2005; Papetti et al., 2006).

1.2. Cichorium Endivia

Το *Cichorium Endivia* ή αλλιώς αντίδι είναι μονοετές φυτό της οικογένειας των συνθέτων, συγγενικό με το ραδίκι και ένα γευστικότατο λαχανικό. Υπάρχουν δύο βασικές ποικιλίες:

1. τα σγουρά - endive (*Cichorium endivia* var. *crispa*) που είναι σγουρές ποικιλίες φυλλώδους φυτού
2. τα πλατύφυλλα - escarole (*Cichorium endivia* var. *latifolium*) που είναι επίπεδες ποικιλίες φυλλώδους φυτού.



Εικόνα 12: Οι δύο βασικές ποικιλίες του *Cichorium Endivia*, δεξιά το escarole (*Cichorium endivia* var. *latifolium*) και αριστερά το endive (*Cichorium endivia* var. *crispa*).

Και των δύο ποικιλιών τα φύλλα έχουν πικρή γεύση, είναι λίγο πιο παχιά από τα φύλλα του μαρουλιού, τα οποία είναι επίσης στενά συνδεδεμένα. Τα άνθη τους είναι λευκού και μπλε χρώματος που στέκονται πολύ πάνω από το φυλλώδες φύλλωμα και έχουν επίσης πασσαλώδη ρίζα. Το *Endiva* είναι ένα χαμηλό αναπτυσσόμενο, μικρό

φυτό και οι περισσότερες ποικιλίες φτάνουν σε ύψος μόλις 15-25.4 cm.

Καλλιεργείται σαν μαρούλι, σε σειρές, ευρείες σειρές ή μπαλώματα. Όπως και άλλα χόρτα, έτσι και αυτό, γεύονται καλύτερα όταν μεγαλώνουν γρήγορα. Χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά ωμό σε σαλάτες. Στα εστιατόρια χρησιμοποιείται συχνά ως γαρνιτούρα γύρω από σαλάτα.



Εικόνα 13: Το *Endiva* είναι ένα χαμηλό αναπτυσσόμενο μικρό φυτό και καλλιεργείται σαν μαρούλι, σε σειρές, ευρείες σειρές ή μπαλώματα .

Σε διάφορες μελέτες βρέθηκαν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες στο πολυφαινολικό κλάσμα του *Cichorium Endiva* (Chelikani, Fita, & Loewen, 2004). Από αυτές τις μελέτες έχει φανεί ότι το *C. Endivia* είναι πλούσια πηγή σημαντικών βιολογικών δραστικών φλαβονοειδών, φαινολικών οξέων, τριτερπενίων και στεροειδών. Ανιχνεύθηκαν επίσης δύο τύποι τριτερπενίων, το ολεανολικό οξύ και το ουρσολικό οξύ σε υψηλή ποσότητα. Η παρουσία βιολογικών δραστικών δευτερογενών μεταβολιτών όπως οι τανίνες, οι στερόλες και τα τερπένια συμβάλλουν στη φαρμακευτική αξία του φυτού (Sofowara, A., 1993). Η παρουσία ιδιαίτερα τερπενοειδών στο *C. Endivia* έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει αρκετές βιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, και ηπατοπροστατευτική (Liu, Hartley, & Liu, 1998) .

2. *Cichorium spinosum*



Εικόνα 14: Χαρακτηριστική εικόνα του φυτού του *Cichorium spinosum*.

Το *Cichorium Spinosum* (ραδίκι της θάλασσας ή σταμναγκάθι) ανήκει στην οικογένεια ASTERACEAE (COMPOSITAE), είναι ένα άγριο βρώσιμο πράσινο φυτό και είναι συγγενικό είδος με το κοινό πικροράδικο, με παρόμοιο άνθος. Διαφέρει στο ότι προτιμά βραχώδεις και παραθαλάσσιες θέσεις και περιβάλλεται από ένα πυκνό αγκαθωτό πλέγμα, για αυτό και επιστημονικά ονομάζεται Κιχώριο το αγκαθωτό (*Cichorium spinosum*). Πρόκειται για το δημοφιλέστερο αυτοφυές άγριο χόρτο του νησιού της Κρήτης που απαντάται από τα χιονισμένα δύσβατα μέρη των ορεινών όγκων έως και τις απόκρημνες ακρογιαλιές του, περιοχές που περιορίζουν την προσβασιμότητα και τον διαθέσιμο χρόνο συγκομιδής του. Η ονομασία του (το αγκάθι της στάμνας) οφείλεται στο αγκάθι που το περιβάλλει και από τη χρήση που είχε αυτό στο στόμιο της στάμνας με το νερό τα παλαιότερα χρόνια, κυρίως για να προστατεύουν το νερό στις στάμνες από τα έντομα.



Εικόνα 15: Το *Cichorium spinosum* αναπτύσσεται σε ενδιαιτήματα όπως αυτά της εικόνας με θάλασσα και παράλια, πετρώδεις πλαγιές και αμμώδεις θέσεις.

Το συναντάμε συνήθως σε ενδιαιτήματά όπως παράλια, πετρώδεις πλαγιές και γενικά αμμώδεις θέσεις. Η γεωγραφική του εξάπλωση περιορίζεται κυρίως στην Ελλάδα. Το σταμναγκάθι εκτιμάται για την υψηλή διατροφική του αξία και χρησιμοποιείται συνήθως ως βασικό συστατικό της λεγόμενης μεσογειακής διατροφής. Είναι γνωστό ως τροφή αλλά και ως βότανο από την αρχαιότητα και ήταν πάντα μια αξιοζήλευτη τροφή την οποία λίγοι είχαν την δυνατότητα να αποκτήσουν καθώς η συγκομιδή του ήταν και είναι μια πολύ επίπονη κουραστική και πολλές φορές επικίνδυνη διαδικασία. Ως χόρτο τρώγεται ολόκληρο, ωμό ως σαλάτα ή βραστό ολόκληρο το φυτό αφού διαχωριστεί από το σκληρό μέρος που συνήθως το περιβάλλει. Θεωρείται θεραπευτικό ενώ το νερό που απομένει μετά το βράσιμο πίνεται και φαίνεται να είναι διουρητικό και να μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης. Επιπρόσθετα μερικές από τις ιδιότητες του είναι οι εξής: χολαγωγό – υπακτικό, αντιοξειδωτικό, τονωτικό – χωνευτικό, αντιρευματικό.

Η χημική σύνθεση του *C. spinosum* και η περιεκτικότητά των φύλλων του σε βιολογικά ενεργά συστατικά τροποποιούνται σημαντικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών. Οι Pokkaew et al., (Pokkaew et al., 2013) ανέφεραν σημαντική διακύμανση των φαινολικών ενώσεων του *Arachis hypogaea* L. κατά τη διάρκεια της φυτικής φάσης των φυτών.

Μελέτες έδειξαν αύξηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας στο 3ο στάδιο ανάπτυξης κάτι που φαίνεται να συνδέεται έντονα με την αυξημένη περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις, όπως το ασκορβικό οξύ, τα φαινολικά οξέα και τις ολικές φαινολικές ενώσεις, ενώ η περιεκτικότητα σε τοκοφερόλες φαίνεται να μην συσχετίζεται σημαντικά με την αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φύλλων *C. Spinosum* (S. A. Petropoulos et al., 2018). Επιπρόσθετως, σε άλλες μελέτες όπου παρατηρήθηκε μείωση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου, η μείωση αυτή συσχετίστηκε με τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε τοκοφερόλες και άλλες βιοδραστικές ενώσεις, όπως τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή. (S. Petropoulos et al., 2017).

3. *Sonchus Asper*



Εικόνα 16: Χαρακτηριστική εικόνα του άνθους του *Sonchus asper*.

Ο στέλεχος του *Sonchus* είναι ένα ευρέως διαδεδομένο φυτό στη φυλή των πικραλίδων που ανήκει στην οικογένεια της μαργαρίτας. Είναι ετήσιο ή διετές χορτάρι που μπορεί να φτάσει μέχρι και 200 cm ύψος. Το *Sonchus Asper* προέρχεται από την Ευρώπη και αναπτύσσεται σε άγρια και άφθονα ανοικτά πεδία, κυρίως σε χωράφια και σε ερημιές στο Πακιστάν (M. R. Khan, Badar, & Siddiquah, 2011) (R. A. Khan, Khan, Sahreen, & Shah, 2012). Το φυτό αυτό έχει αγκαθωτά φύλλα, μπλε-πράσινα, απλά, λογχοειδή, με κυματιστά και μερικές φορές λοφώδη περιθώρια, καλυμμένα με αγκάθια τόσο στα περιθώρια όσο και κάτω, όπως επίσης και κίτρινα λουλούδια που μοιάζουν με αυτά της πικραλίδας. Η βάση του φύλλου περιβάλλει το στέλεχος. Τα φύλλα και οι μίσχοι εκπέμπουν ένα γαλακτώδες σαπούνι όταν κόβεται.

4. Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση (με τη χρήση μοριακών μεθόδων) της αντιοξειδωτικής και χημειοπροστατευτικής δράσης καθώς και της αναγωγικής δύναμης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων άγριων βρώσιμων φυτών/χόρτων *Cichorium Endivia*, *Cichorium Intybus*, *Cichorium Spinosum* και *Sonchus Asper*.

Στο πρώτο μέρος της μελέτης, αρχικά πραγματοποιήθηκε η μέθοδος Folin–Ciocalteu για την ανάλυση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων. Στη συνέχεια για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι εξουδετέρωσης των σταθερών χημικών ριζών DPPH•, ABTS^{•+} και της ρίζας υπεροξειδίου (O₂^{-•}), από τις πολυφαινολικές ενώσεις των φυτικών εκχυλισμάτων, και τέλος η μέθοδος αναγωγής του Fe⁺³ (Reducing Power Assay).

Στο δεύτερο μέρος εξετάστηκε η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων έναντι βλαβών στο DNA, οι οποίες προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA στο οποίο και παρατηρήθηκε η αναστολή της πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων που προκαλούνται από ρίζες περοξυλίου (ROO•).

Στην συνέχεια, στο φυτικό εκχύλισμα που παρουσίασε την ισχυρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών και τη μεγαλύτερη αναγωγική δράση, πραγματοποιήθηκε η μελέτη της επίδρασης του στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μυοβλαστών επιμύου. Χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής και φασματοφωτομετρικές μεθόδους προσδιορίσαμε δείκτες οξειδωτικού στρες για να εξετάσουμε εάν το φυτικό αυτό εκχύλισμα παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση στα κύτταρα των μυοβλαστών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Πληροφορίες για τα εκχυλίσματα εδώδιμων χόρτων

Εξετάστηκαν 4 εκχυλίσματα εδώδιμων χόρτων από το εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα εκχυλίσματα άγριων βρώσιμων φυτών/χόρτων ήταν των φυτών *Cichorium Endivis*, *Cichorium Intybus*, *Cichorium Spinosum* και *Sonchus Asper*. Παρακάτω παρατίθεται ένας πίνακας με πληροφορίες για τα παραπάνω εκχυλίσματα.

Πίνακας 1: Πληροφορίες για τα 4 εκχυλίσματα εδώδιμων χόρτων *Cichorium* spp. *Cichorium Endivis* (AREM), *Cichorium Intybus* (KAEM), *Cichorium Spinosum* (CSEM) και *Sonchus Asper* (SOCJ_1) όπως μας στάλθηκαν από το εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Εκχυλίσματα Εδώδιμων Χόρτων			
Plant	Type of extract	Extract Code	Description
<i>Cichorium</i> spp. <i>Cichorium Endivia</i>	enriched decoction	AREM_3	Το εκχύλισμα είναι πλούσιο σε φαινολικά οξέα με βασικότερο το κιχορικό ενώ μεταξύ άλλων περιέχει γλυκοσίδες φλαβονοειδών όπως η λουτεολίνη και η κερκετίνη.
<i>Cichorium</i> spp. <i>Cichorium Intybus</i>	enriched decoction	KAEM_3	Το εκχύλισμα είναι πλούσιο σε φαινολικά οξέα με βασικότερο το κιχορικό ενώ μεταξύ άλλων περιέχει γλυκοσίδες φλαβονοειδών όπως η λουτεολίνη και η κερκετίνη.
<i>Cichorium spinosum</i>	decoction	CSEM_A1	Βασικό μεταβολίτη του εκχυλίσματος αποτελεί το κιχορικό οξύ, ενώ είναι πλούσιο σε γλυκοσίδες φλαβονοειδών. Μεταξύ άλλων περιέχονται επίσης σесκιτερπενικές λακτόνες και άλλα φαινολικά οξέα.
<i>Sonchus asper</i>	decoction	SOCJ_1	Το εκχύλισμα περιέχει ως επί το πλείστον γλυκοσίδες φλαβονοειδών και φαινολικά οξέα με βασικότερο το κιχορικό οξύ. Ασθενέστερη είναι η παρουσία σесκιτερπενικών λακτονών.

Τα υδατικά εκχυλίσματα (αφεψήματα) που προήλθαν από το βρασμό του εδώδιμου χόρτου, επεξεργάστηκαν μέσω μιας αλληλουχίας ειδικευμένων ρητινών προσρόφησης (συσκευές/στήλες απιονισμού που περιέχουν μίγμα ιοντοανταλλακτικών ρητινών ειδικής σύνθεσης) με σκοπό την κατακράτηση των περιεχομένων πολυφαινόλων. Έτσι δημιουργήθηκε ένα εκχύλισμα πλούσιο σε πολυφαινόλες, έτοιμο για ανάλυση.

2. Μέθοδος Folin–Ciocalteu reagent (FCR)

2.1. Αρχή της μεθόδου

Η ανάλυση του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου βασίζεται στη μέθοδο Folin–Ciocalteu. Το αντιδραστήριο φαινόλης Folin–Ciocalteu (FC) είναι ένα μίγμα φωσφορομολυβδαινικού και φωσφονικού άλατος που χρησιμοποιείται για τη *in vitro* χρωματομετρική δοκιμασία φαινολικών και πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών.

Το αντιδραστήριο φαινόλης Folin & Ciocalteu δεν περιέχει φαινόλη, αντίθετα, το αντιδραστήριο θα αντιδράσει με φαινόλες και μη φαινολικές αναγωγικές ουσίες για να σχηματίσουν χρωμογόνα που μπορούν να ανιχνευθούν φασματοφωτομετρικά.

Η ανάλυση F-C βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων σε αλκαλικό μέσο από τις φαινολικές ενώσεις σε φωσφομολυβδικά όξινα σύμπλοκα που καθορίζονται φασματοφωτομετρικά περίπου στα 765 nm. Το μπλε χρωμοφόρο που σχηματίζεται αποτελείται από άλατα φωσφοβόλφραμικού / φωσφορομολυβδαινίου και η μέγιστη απορρόφηση εξαρτάται από τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων.

Το γαλλικό οξύ χρησιμοποιείται ως πρότυπη ένωση αναφοράς και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα γαλακτικού οξέος (mg/ml).

2.2. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά διαλύουμε 25g Na_2CO_3 σε 10ml H_2O . Στη συνέχεια προσθέτουμε τα αντιδραστήρια σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

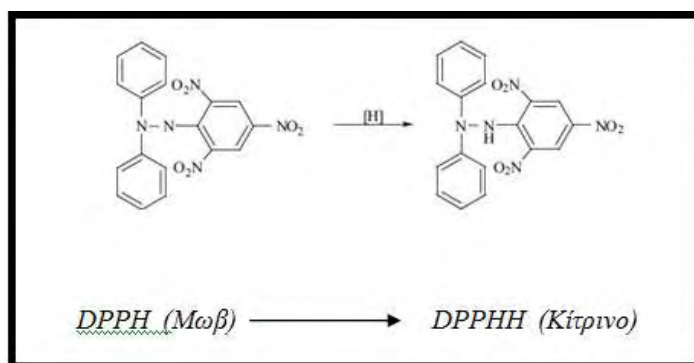
Πίνακας 2: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων (Μέθοδος Folin–Ciocalteu reagent (FCR)).

	Δείγμα (3X)	Δείγμα χωρίς FC (2X)	Τυφλό
H₂O	1000 μl	1100 μl	1200 μl
Folin	100 μl	-	100 μl
Δείγμα	20 μl	20 μl	-
Επώαση 3 min			
Na₂CO₃	280 μl	280 μl	280 μl
H₂O	600 μl	600 μl	600 μl
Επώαση 45min			

3. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•

3.1. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος παρουσιάστηκε το 1995 από τους Brand-Williams et al. Ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH• μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prior, Wu, & Schaich, 2005). Η 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο (DPPH•) είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο (DPPH•) ανάγεται και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλδραζίνη (DPPH:H), όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 17). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.



Εικόνα 17: Η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο (DPPH•) ανάγεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλδραζίνη (DPPH:H).

3.2. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH• την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (100 μ M ρίζας DPPH•) και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 25, 50, 100 μ g/ml). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μ l. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά η μεθανόλη και τέλος το διάλυμα της ρίζας (100 μ M ρίζας DPPH•) με σταθερό γρήγορο ρυθμό, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1). Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή Hitachi U-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης (τυφλό). Τα δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη και DPPH αποτελούσαν τους θετικούς μάρτυρες. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η ίδια η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (Πίνακας 2). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα ενώ το διάλυμα της ρίζας DPPH• σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

Πίνακας 3: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων.

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50μl
Μεθανόλη	950 μ l	950 μ l	900 μ l	900 μ l	900 μ l	900 μ l	900μl
DPPH•	-	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50μl
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 4: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη.

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50μl
Μεθανόλη	950 μ l	900 μ l	950 μ l	950 μ l	950 μ l	950 μ l	950μl
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

3.3. Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 517nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας DPPH και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας DPPH} = [(A_0 - A_d) / A_0] \times 100$$

όπου:

A₀: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_d: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα).

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 18.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης *r* κατά Spearman.

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

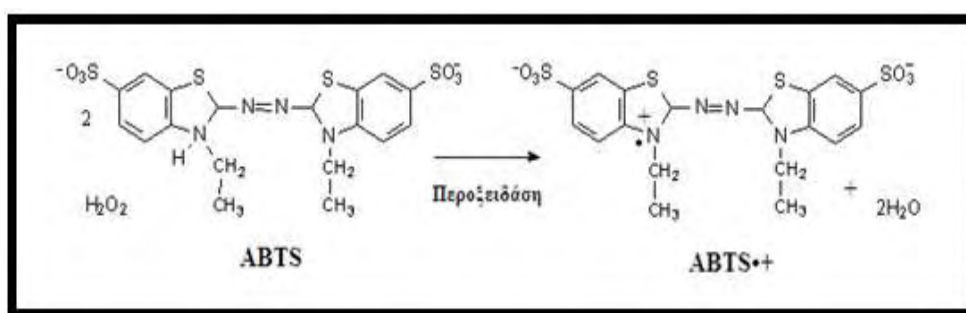
4. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•+

4.1. Αρχή της μεθόδου

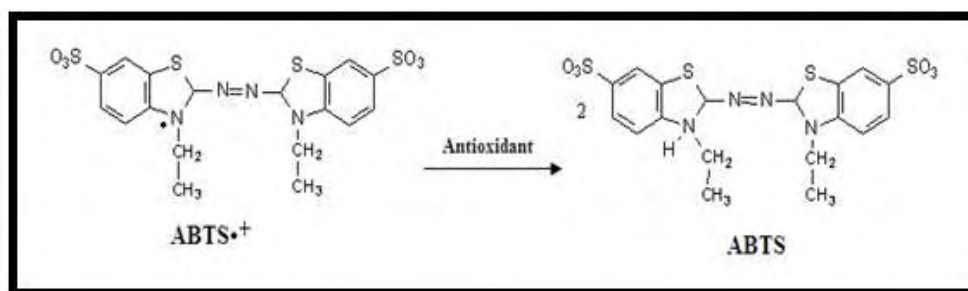
Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας ABTS^{•+} αναπτύχθηκε από τους Miller και Rice-Evans (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996), και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Το ABTS, [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-

sulphonic acid)], παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (κατιόν) (Εικόνα 18). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει αρχικά να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα $\text{ABTS}^{\bullet+}$, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Εικόνα 19) (Miller, Brzezinska-Slebozinska, & Madsen, 1993; Prior et al., 2005; Re et al., 1999).



Εικόνα 18: Η οξείδωση του ABTS σε δραστική ρίζα.



Εικόνα 19: Η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με την ρίζα $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

4.2. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των αραιώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$).

Διάλυμα ABTS (1mM): Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10.97 mg ABTS και το διαλύουμε σε H_2O .

Διάλυμα H_2O_2 (30 μM): Για τελική συγκέντρωση H_2O_2 30 μM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 600 μM . Από το stock διάλυμα H_2O_2 30% 8,8 M αραιώνουμε με H_2O_2 , ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600 μM .

Διάλυμα HRP (6 μM): Διαλύουμε 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια κάνουμε μια αραιώση 1/10 και χρησιμοποιούμε αυτό το διάλυμα για την αντίδραση.

Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια του πειράματος. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1050 μl στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και το ένζυμο περοξειδάση (HRP). Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5).

Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για κάθε φυτικό εκχύλισμα ενώ το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων (ABTS, H_2O_2 , HRP) χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control). Μετά την επώαση και την προσθήκη των εκχυλισμάτων ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη χωρίς την παρουσία του ενζύμου (Πίνακας 6).

Πίνακας 5: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων.

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
H₂O	450 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ l	400μl
ABTS	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ l	500μl
H₂O₂	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ l	50μl
HRP	-	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50ml	50ml
V τελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1mL	1mL	1mL
Επώαση 45 min							
	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50μl
V τελ	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl

Πίνακας 6: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη.

	Τυφλό	C1	C2	C3	C4	C5
H₂O	450 μ L	450 μ L	450 μ L	450 μ L	450 μ L	450 μL
ABTS	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μL
H₂O₂	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μL
Εκχύλισμα	-	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μL
V τελ	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl	1050μl

4.3. Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 730nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας ABTS^{•+} και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας ABTS}^{\bullet+} = [(A_0 - A_\delta) / A_0] \times 100$$

όπου:

A₀: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_δ: Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (εκχύλισμα).

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 18.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της εξουδετέρωσης της ρίζας του ABTS^{•+} που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman.

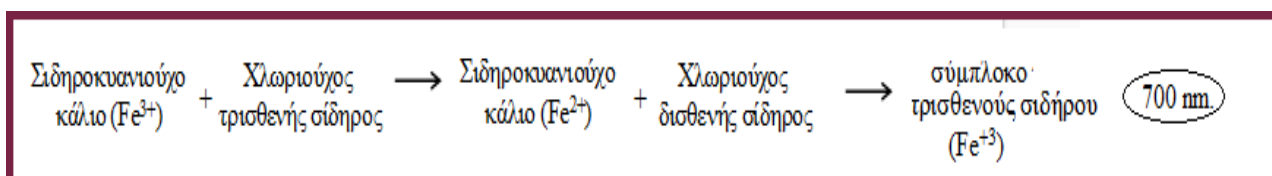
Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του ABTS^{•+} κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

5. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης (REDUCING POWER)

5.1. Αρχή της Μεθόδου

Η αναγωγική δύναμη διαφόρων ουσιών προσδιορίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Yen & Duh (1994). Η μέθοδος αυτή σχετίζεται με την ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων μιας ουσίας και μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων δειγμάτων. Ενώσεις με ισχυρή αναγωγική δύναμη είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουντα οξειδωμένα μόρια, που παράγονται κατά την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Σε αυτή τη δοκιμασία, το κίτρινο χρώμα του υπό μελέτη διαλύματος αλλάζει σε διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε, ανάλογα με την αναγωγική δύναμη της κάθε μελετώμενης ουσίας. Παρουσία αναγωγικού περιβάλλοντος προκαλείται μετατροπή του συμπλόκου Fe^{+3} /σιδηροκυανιούχο κάλιο στην ανηγμένη μορφή του σιδήρου (Fe^{+2}). Με τη μέτρηση του σχηματισμού του κυανού χρώματος (Pearl's Prussian blue) στα 700 nm είναι δυνατό να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του ιόντος Fe^{+3} .

Ουσίες με αναγωγική ισχύ αντιδρούν με το σιδηροκυανιούχο κάλιο ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$) (που περιέχει Fe^{+3}) και το ανάγουν σε ανηγμένο σιδηροκυανιούχο κάλιο ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_4$) (που περιέχει Fe^{+2}), το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με χλωριούχο σίδηρο και το μετατρέπει σε ένα σύμπλοκο τρισθενούς σιδήρου (Fe^{+3}). Αυτό το προϊόν που σχηματίζεται έχει κυανό χρώμα και φωτομετρείται στα 700 nm. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατό να προσδιοριστεί και η συγκέντρωση του ιόντος Fe^{+3} .



Εικόνα 20: Σχηματισμός συμπλόκου τρισθενούς σιδήρου (Fe^{+3}) με κυανό χρώμα που φωτομετρείται στα 700 nm.

5.2. Παρασκευή Διαλυμάτων

1) Ρυθμιστικό διάλυμα με φωσφορικά και νάτριο (Sodium Phosphate buffer) 0.2M, pH 6.6

Για να φτιάξουμε το διάλυμα αυτό, διαλύουμε 13,9g δισόξινουφωσφορικού νατρίου (sodium phosphate monobasic, NaH_2PO_4) σε 500 ml απιονισμένου νερού και 26.825 gόξινουφωσφορικούδινάτρίου(sodiumphosphatedibasicheptahydrate, Na_2HPO_4) σε 500 ml απιονισμένου νερού.Στη συνέχεια προσθέτουμε 62,5 ml του πρώτου διαλύματος και 37,5 ml του δεύτερου διαλύματος σε 200 ml απιονισμένου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 6.6.

2) Σιδηροκυανιούχο κάλιο (Potassiumferricyanide, $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$, 1% w/v)

Διαλύουμε 0,1 g $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_3$ σε 10 ml απιονισμένου νερού. Τυλίγουμε το διάλυμα με αλουμινόχαρτο καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

3) Χλωριούχος τρισθενής σίδηρος (Ferricchloride, FeCl_3 , 1 % w/v)

Διαλύουμε 0,01g FeCl_3 σε 10 ml απιονισμένου νερού. Τυλίγουμε το διάλυμα με αλουμινόχαρτο καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

4) Τριχλωροξικό οξύ (Trichloroaceticacid, TCA, 10% w/v)

Προσθέτουμε 10 ml από ένα πυκνό διάλυμα TCA περιεκτικότητας 100% σε 90 ml απιονισμένου νερού.

1.1.Πειραματική Διαδικασία

1. Διαλύουμε το δείγμα μας στο ρυθμιστικό διάλυμα (0,2 M, pH 6,6).
2. Προσθέτουμε 250μl από το διάλυμα του δείγματος μας σε 250 μlσιδηροκυανιούχουκαλίου1%.
3. Επωάζουμε σε υδατόλουτρο στους 50°C για 20 λεπτά.
4. Κρυώνουμε τα δείγματά μας και προσθέτουμε 250 μlTCA 10%.
5. Φυγοκεντρούμε στις 3000 rpm για 10 λεπτά.

6. Συλλέγουμε το υπερκείμενο (250 μ l) και προσθέτουμε 250 μ l απιονισμένου νερού και 500 μ l χλωριούχου τρισθενούς σιδήρου 0,1%.

7. Επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φωτομετρούμε στα 700 nm.

Οι μετρήσεις γίνονται εις τριπλούν.

Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 700 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του σιδηροκυανιούχου καλίου.

Πίνακας 7: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων. (Μέθοδος REDUCING POWER)

3X	Τυφλό (Blank)	Δείγμα ελέγχου(Control)	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3
εκχύλισμα	-	-	250 μ l	250 μ l	250 μ l
Ρυθμιστικό διάλυμα(0,2M,pH 6.6)	500 μ l	250 μ l	250 μ l	250 μ l	250 μ l
Σιδηροκυανιούχο κάλιο	-	250 μ l	250 μ l	250 μ l	250 μ l
Επώαση στους 50 °C για 20 λεπτά					
TCA	250 μ l	250 μ l	250 μ l	250 μ l	250 μ l
Φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 10 λεπτά					
dH ₂ O	250 μ l	250 μ l	250 μ l	250 μ l	250 μ l
Χλωριούχος τρισθενής σίδηρος	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l

Πίνακας 8: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων αυτή τη φορά χωρίς την παρουσία του σιδηροκυανιούχου καλίου. (Μέθοδος REDUCING POWER)

3X	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3
Δείγμα	250μl	250μl	250μl
Ρυθμιστικό διάλυμα(0,2M,pH 6.6)	250μl	250μl	250μl
TCA	250μl	250μl	250μl
Φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 10 λεπτά			
dH₂O	250μl	250μl	250μl
Χλωριούχος τρισθενής σίδηρος	50μl	50μl	50μl

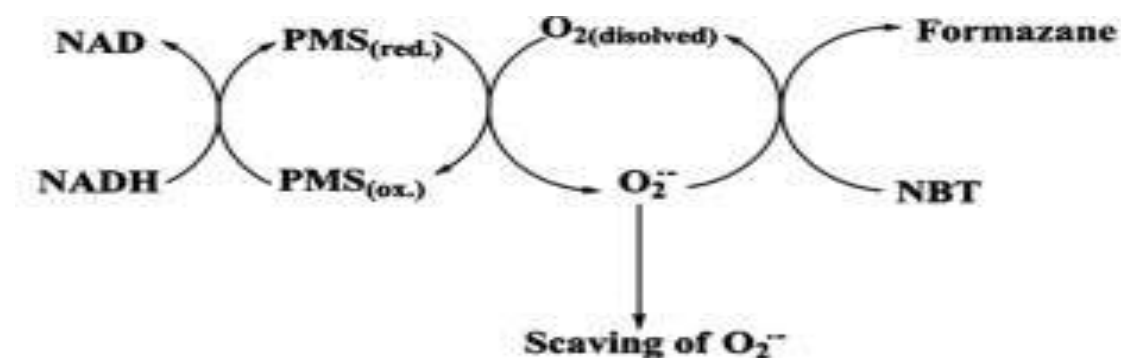
5.3. Υπολογισμοί

Η αναγωγική δύναμη υπολογίζεται ως η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί 50% (0.5AU) μείωση της απορρόφησης σε σύγκριση με την απορρόφηση του δείγματος ελέγχου (control).

6. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $O_2^{\cdot-}$

6.1. Αρχή Μεθόδου

Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\cdot-}$ πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του Gulcinetal., 2004. Η ρίζα $O_2^{\cdot-}$ έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί θανάτωση των κυττάρων, απενεργοποίηση ενζύμων και αποικοδόμηση του DNA, των κυτταρικών μεμβρανών και των πολυσακχαριτών. Η ρίζα αυτή επίσης, ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στην υπεροξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και πιθανώς άλλων ευαίσθητων ουσιών. Οι ανιονικές ρίζες σουπεροξειδίου προέρχονται από τα συστήματα PMS-NADH μέσω οξείδωσης του NADH και αναλύονται μέσω της μείωσης του NBT. Το $O_2^{\cdot-}$ μειώνει το κίτρινο χρώμα που προέρχεται από το NBT^{2+} με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ένα μπλε χρώμα το οποίο μετράται φασματοφωτομετρικά στα 560nm. Ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό του NBT (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Σχηματισμός του προϊόντος φορμαζάνη από τη ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) μέσω του συστήματος μεθοσουλφονική φαιναζίνη (PMS)-νικοτιναμιδο αδενινονουκλεοτίδιο (NADH).

Πιο αναλυτικά, σε 2,5 ml Tris-HCl (16mM, pH 8.0) προστίθενται 500 μ l NBT (300 μ M), 500 μ l NADH (468 μ M) και 250 μ l πρωτεΐνης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 500 μ l PMS (60 μ M). Τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 10 λεπτά στους 25°C. Η απορρόφηση μετράται στα 560 nm. Σε κάθε πείραμα τα δείγματα που δεν περιείχαν PMS (60 μ M) αποτελούσαν το τυφλό και τα δείγματα που δεν περιείχαν πρωτεΐνη αποτελούσαν το μάρτυρα. Επίσης, ελέγχθηκε αν οι πρωτεΐνες

απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 560 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\cdot -}$ υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_\delta) / A_0 \times 100$$

A_0 : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 560 nm

A_δ : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 560 nm

Υλικά

1) Tris-HCl buffer (16mM, pH 8.0)

2) NBT(nitrobluetetrazolium) (300μM),

3) NADH (468μM)

4) PMS (phenazine methosulfate) (60μM)

5) Ascorbic acid → Χρησιμοποιείται σαν Positive control (25-175μg/ml)

6.2. Πειραματική διαδικασία

Σε 2,5 ml Tris-HCl (16mM, pH 8.0) προσθέτουμε 0.5 ml NBT (300μM), 0.5 ml NADH (468μM) και 250 μl δείγματος. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 0.5 ml PMS (60μM) στο μίγμα. Τα δείγματα επώαστηκαν για 5 λεπτά και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 560 nm. Μειωμένη απορρόφηση σημαίνει αυξημένη δραστηριότητα εξουδετέρωσης των ανιόντων σουπεροξειδίου.

Πίνακας 9: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων. (Μέθοδος εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\cdot -}$ ●)

3X	Blank	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Φυτικό εκχ.	-	-	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
dH ₂ O	-	50 μl	-	-	-	-	-
Tris-HCl (16mM,pH 8.0)	800μl	625 μl	625 μl	625 μl	625 μl	625 μl	625 μl
NBT (300μM)	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml
NADH (468μM)	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml
PMS (60μM)	-	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml

Πίνακας 10: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων χωρίς την προσθήκη PMS . (Μέθοδος εξουδετέρωσης της ρίζας O₂- ●)

2X	C1	C2	C3	C4	C5
Φυτικό εκχ.	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
dH ₂ O	-	-	-	-	-
Tris-HCl (16mM,pH 8.0)	750 μ l	750 μ l	750 μ l	750 μ l	750 μ l
NBT (300 μ M)	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml
NADH (60 μ M)	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml	0.125 ml

7. Μέθοδοι προσδιορισμού αντιμεταλλαξιγόνου δράσης.

Γενικά

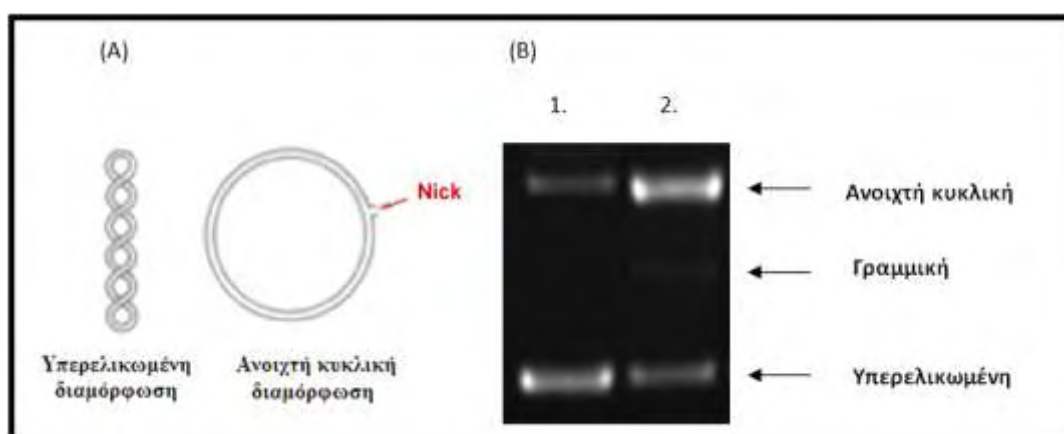
Η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως η μεταλλαξιγένεση και η καρκινογένεση (Stagos et al., 2005). Η παρατήρηση της αναστολής της βλάβης του DNA είναι ενδεικτική της πιθανής αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των πολυφαινολικών ενώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων. Για την εκτίμηση αυτής της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, μέσω αναστολής της πρόκλησης βλαβών στο DNA από ελεύθερες ρίζες, χρησιμοποιήθηκε ρίζα περοξυλίου (ROO•).

Για τον προσδιορισμό της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο το πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά δίκλωνα μόρια DNA που υπάρχουν στα βακτήρια και τις ζύμες, όπου και αντιγράφονται ως ανεξάρτητες μονάδες. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα αυτών, τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή τους σε αντίξοες συνθήκες, καθώς συνήθως φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Το πλασμιδιακό DNA πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να απομονωθεί πολύ εύκολα και σε μεγάλη ποσότητα. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα του είναι ότι όταν τρέχει σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις (Εικόνα 22).

- Την **υπερελικωμένη** διαμόρφωση (Supercoiled conformation) στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπακνωμένη του μορφή.

- Την **ανοιχτή κυκλική** (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλωνα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν υπάρχουν και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν σπασίματα στο DNA.
- Την **γραμμική** διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλωνα σπασίματα.

Οι παραπάνω διαμορφώσεις τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα gel ηλεκτροφόρησης. Η τελευταία εξαρτάται από το μέγεθος της διαμόρφωσης και μάλιστα όσο πιο μικρή είναι αυτή τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αгарόζης. Άρα το πλασμιδιακό DNA με υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτο, δεύτερο εκείνο με τη γραμμική και τρίτο εκείνο με την ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.



Εικόνα 22: Διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA.

(A) Σχηματική απεικόνιση της αλλαγής της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA μετά από την πρόκληση σε αυτό μονόκλωνων θραυσμάτων (nicks).

(B) Φωτογραφία πηκτώματος αгарόζης στο οποίο φαίνεται οι τρεις κύριες διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA. Σειρά 1: πλασμιδιακό DNA χωρίς την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα. Σειρά 2: πλασμιδιακό DNA μετά από επίδραση οξειδωτικού παράγοντα

Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων απέναντι στην δράση ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, βασίζεται στην παρεμπόδιση της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Με βάση την αρχή της μεθόδου, ως τώρα έχει μελετηθεί η προστατευτική δράση διάφορων φυτικών εκχυλισμάτων και δραστικών μορίων απέναντι στην ικανότητα της ρίζας $\text{ROO}\cdot$ να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA και να αλλάζουν την διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ απομονώθηκε από μεσαίας κλίμακας καλλιέργεια (100 mL) βακτηριακών κυττάρων E. Coli που περιείχαν μόνο το συγκεκριμένο πλασμίδιο (Bluescript-SK+). Αρχικά 3 mL θρεπτικού μέσου (1,5 gr LB broth, 1 gr NaCl, 100 µg/mL αμπικιλίνη) επιμολύνονται με μικρή ποσότητα των βακτηρίων E. Coli που φέρουν το πλασμίδιο Bluescript-SK+. Αφού αναπτύχθηκε αυτή η μικρή καλλιέργεια για 4 ώρες έγινε επιμόλυνση με αυτήν στο υπόλοιπο θρεπτικό μέσο(100 mL). Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε επωαστικό κλίβανο με ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C για 12-13 ώρες σε 210 στροφές. Ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Η συνολική καλλιέργεια χωρίζεται σε δύο επιμέρους καλλιέργειες των 50 mL. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρούνται για 20 min στα 2057 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα των βακτηρίων προστίθενται 4 mL διαλύματος 1 [(100mL)-50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA, pH 8] και κατόπιν ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος. Τα δείγματα παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου στα οποία στην συνέχεια προστίθενται 8 mL διαλύματος 2 [(50mL) - 0,2 N NaOH, 1% SDS) και αναδεύονται 4-5 φορές πολύ απαλά για την αποφυγή απομόνωσης μαζί με το πλασμιδιακό DNA και χρωμοσωμικού DNA. Επειδή το διάλυμα είναι πολύ αλκαλικό, το πλασμιδιακό DNA μεταβαίνει από την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, για αυτό αμέσως μόλις διανυγεί το διάλυμα προστίθεται 6 mL διαλύματος 3 [(100 mL)- 5 M οξικό κάλιο C₂H₃O₂K, 11,5 mL οξικού οξέος]. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 7-8 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 20 min στα 3214g στους 4°C, στην συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του και η φυγοκέντρωση επαναλαμβάνεται.

Κατόπιν στο υπερκείμενο που συλλέγεται, προστίθενται διάλυμα προπανάλης (-20°C) σε όγκο ίσο με 60% του όγκου του υπερκείμενου. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 3-5min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούνται για 20 min στα 3214g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v (σε συνθήκες -20°C) σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρωση των δειγμάτων για 20 min στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (πλασμιδιακό DNA) αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε διάλυμα TE (10 mM Tris-Cl,

1 mM EDTA) στο οποίο είχε προστεθεί ένζυμο RNase 10 $\mu\text{g/mL}$ για τη διάσπαση του RNA.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 $\mu\text{g/mL}$. Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280 nm απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 nm το DNA). Όταν ο λόγος είναι $>1,8$ η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή. Για τον έλεγχο της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 V. Στην συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 $\mu\text{g/mL}$ βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H_2O για 30 min. Ακολουθεί έκθεση του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογράφιση του με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech. Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Alpha View της Alpha Innotech γίνεται ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ήταν καλής καθαρότητας και βρίσκεται κατά 10-20% στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Το πλασμίδιο τελικά χωρίζεται σε aliquots και τοποθετείται στους -20°C .

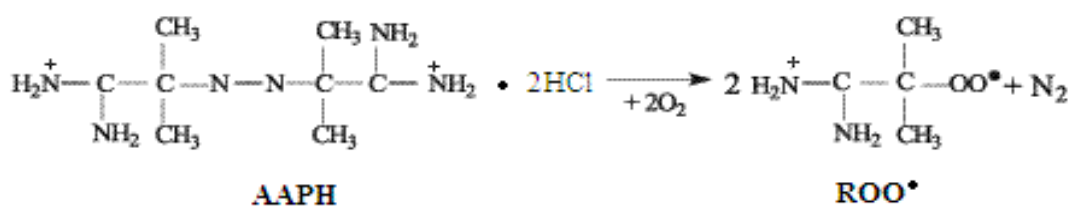
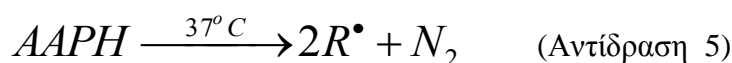
8. Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

8.1. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος εκτίμησης της προστατευτικής δράσης απέναντι στη δράση των ριζών ROO• βασίζεται στη μέθοδο των Chang et al. (2001).

Οι ρίζες ROO• είναι από τις πιο συνηθισμένες ρίζες που παράγονται μέσα στον οργανισμό, αποτελώντας έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην έναρξη της αλληλουχίας αντιδράσεων της οξείδωσης των λιπιδίων. Η χημεία των ριζών αυτών ποικίλει ανάλογα με την ομάδα R- που τις απαρτίζουν καθώς και το περιβάλλον στο οποίο παράγονται.

Ως πηγή παραγωγής ριζών ROO• χρησιμοποιείται το AAPH [2,2'-Azobis (2-amidinopropane hydrochloride)]. Το AAPH σε θερμοκρασία 37°C διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών ROO• (Αντιδράσεις 5,6)(Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Χημική δομή της ένωσης AAPH και η αντίδραση της θερμικής της διάσπασης και του σχηματισμού των ριζών ROO•.

Οι ρίζες ROO• έχουν την ικανότητα επίσης να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή των ριζών στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Η εκτίμηση λοιπόν της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.

Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στην διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο φυτικό εκχύλισμα ή την περιεχόμενη δραστική ουσία αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση αυτών απέναντι στην δράση των ριζών ROO•.

8.2. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το gel αгарόζης περιεκτικότητας 0,8 %, με διάλυση 0,72 g αгарόζης σε 90 ml TBE 1x (10mM Tris-Cl, Boric Acid, 0,5M EDTA), και προσθήκη του στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Στη συνέχεια γίνεται η προετοιμασία των διαλυμάτων αντίδρασης ως εξής:

- **PBS (pH=7,4)** : NaCl 137mM (8gr/1000ml), KCl 2,7mM (0,2gr/1000 ml), Na₂HPO₄ 4,1mM (1,44gr/1000ml), KH₂PO₄ 1,5mM (0,2gr/1000ml). Το διάλυμα αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **AAPH 100mM**: 13,56mg AAPH σε 500μl PBS. Το διάλυμα προετοιμάζεται λίγο πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο, καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

- **AAPH 15 mM**: προκύπτει με αραιώση 1/2,67 του διαλύματος AAPH 100mM . Το διάλυμα προετοιμάζεται πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο.

Εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων σε έξι συγκεντρώσεις των 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 μg/ml.

Τα συστατικά της αντίδρασης (συνολικού όγκου 10μl) ήταν τα εξής: PBS, DNA Bluescript plasmid 3,2μg, AAPH 15 mM και το εξεταζόμενο εκχύλισμα για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής του δράσης, στις παραπάνω συγκεντρώσεις.

Η συγκέντρωση της ένωσης AAPH επιλέχθηκε μετά από δοκιμή δράσης διάφορων συγκεντρώσεων (1-15 mM) στα 45 min στους 37 °C. Η συγκέντρωση των 15 mM προκαλεί μετατροπή του υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA σε ανοιχτό κυκλικό κατά 70-75% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα χωρίς να το μετατρέπει στην γραμμική διαμόρφωση.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 11. Για την ανάδευση και ομογενοποίηση των συστατικών

χρησιμοποιήθηκαν συσκευές ανάδευσης και στροβιλισμού (spin και vortex) (Εικόνα 24)

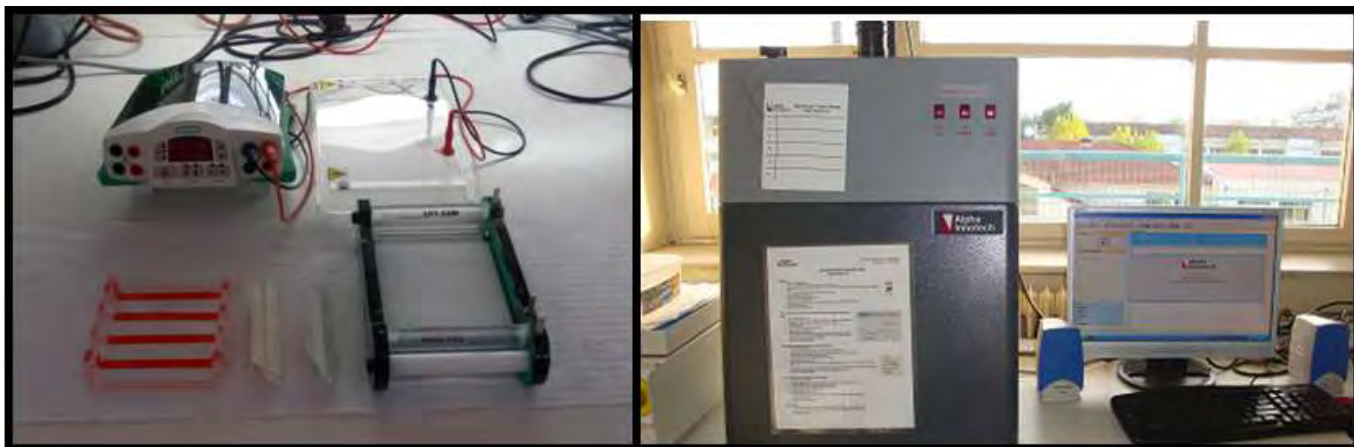
Πίνακας 11: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων. (Μέθοδος πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA μέσω σχηματισμού των ριζών ROO•)

	PBS	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	AAPH
Control (-)	8 μ l	-	2 μ l	-
AAPH 15mM (+)	4 μ l	-	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (4 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (8 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (16 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (32 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (64 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (128 μ g/ml)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	4 μ l
Εκχ. (128 μ g/ml)	5 μ l	3 μ l	2 μ l	-



Εικόνα 24: Συσκευές ανάδευσης vortex και στροβιλισμού spin.

Κάθε δείγμα δοκιμάζεται και μόνο του μαζί με το πλασμιδιακό DNA στην μεγαλύτερη εξεταζόμενη συγκέντρωσή του για να παρατηρηθεί η πιθανή επίδραση του δείγματος στην υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.



Εικόνα 25: Συσκευές και διάταξη ηλεκτροφόρησης και Σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech.

Τα δείγματα τοποθετούνταν στο σκοτάδι στους 37°C για 45 min. Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 μ l διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer - Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) (Εικόνα 22) και ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) σε πηκτή (gel) αгарόζης 0,8%w/v στα 70 V για 60 min. Χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης Scie-Plas (M.B.) και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8). Στη συνέχεια το gel τοποθετήθηκε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5 μ g/ml) για 30 min και ακολουθούσε αποχρωματισμός του σε απιονισμένο νερό επίσης για 30 min. Οι πηκτές μετά τον αποχρωματισμό τους τοποθετούνταν σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογραφίζονταν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech (Εικόνα 25). Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Alpha View της Alpha Innotech έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.

1.1. Στατιστική ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης της ρίζας ROO•, που παράγεται από την θερμική αποικοδόμηση του AAPH υπολογίστηκε ως εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = [(S0 - S)/(S_{\text{control}} - S0)] \cdot 100$$

Όπου:

S_{control} = το ποσοστό υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control,

$S0$ = το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 2,5mM AAPH) και

S = το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα (15mM AAPH).

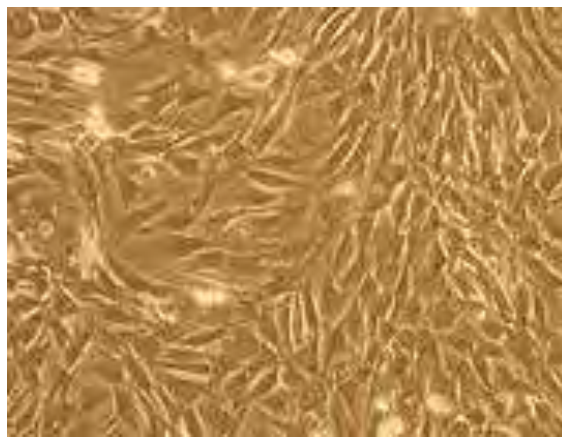
Από τα τρία ποσοστά αναστολής για κάθε εκχύλισμα βρέθηκε η μέση τιμή (\bar{x}) καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE) για το καθένα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 18.0 και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του test του Dunnet.

9. Εξέταση της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος

AREΜσε κύτταρα μυοβλαστών ποντικού C2C12.

Μυϊκά κύτταρα C2C12

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε είναι της κυτταρικής σειράς μυοβλαστών ποντικού C2C12. Τα κύτταρα αυτά παρατηρήθηκαν αρχικά από τους Yaffe και Saxel μέσω ενός μονοπατιού των μυοβλαστών τα οποία καλλιεργήθηκαν από πλατύ μυ ποντικών μετά από μηχανικό τραυματισμό. Αυτά τα κύτταρα είναι ικανά να διαφοροποιούνται. Αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της διαφοροποίησης των μυοβλαστών και οστεοβλαστών, στην έκφραση διάφορων πρωτεϊνών, και στην εξερεύνηση μηχανικών μονοπατιών. Η κυτταρική σειρά C2C12 είναι μια αθάνατη σειρά σκελετικών μυοβλαστών ποντικού, που αρχικά προέρχεται από δορυφορικά κύτταρα από το μυ του μηρού του ζώου 70 ώρες μετά από σοβαρούς τραυματισμούς (Yaffe και Saxel, 1977). Αναπτύσσονται ως αδιαφοροποίητοι μυοβλάστες σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο.



Εικόνα 26: C2C12 κύτταρα σε οπτικό μικροσκόπιο.

9.1. Καλλιέργεια των μυοβλαστών ποντικού (σειρά C2C12)

Οι μυοβλάστες αναπτύχθηκαν σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης [(100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml)] και σε επώαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37°C και το CO₂ 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με κύτταρα. Τότε γίνεται ανακαλλιέργεια των κυττάρων (split) αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 500 μL τρυψίνης 0,25%. Ακολουθούσε επώαση με την τρυψίνη για 5 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης και στη συνέχεια επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων γινόταν σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

Θρεπτικά μέσα και υλικά πειράματος

- i) Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των κυττάρων C2C12 είχε ως πρώτες ύλες τα εξής:
 - ✓ Θρεπτικόμέσο Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gilbo BRL 41966)
 - ✓ 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed)
 - ✓ Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνηαντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution, Gilbo)
 - ✓ Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed)

Χρησιμοποιήθηκαν δύο θρεπτικά μέσα:

α) Θρεπτικό μέσο με 10% FBS, για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που περιείχε:

- 250ml DMEM41966
- 25mlFBS
- 2,5ml pen/str
- 2,5ml Γλουταμίνη

β) Θρεπτικό μέσο χωρίς FBS, στο στάδιο της πρόσθεσης των διαφορετικών αραιώσεων των φυτικών εκχυλισμάτων που περιείχε:

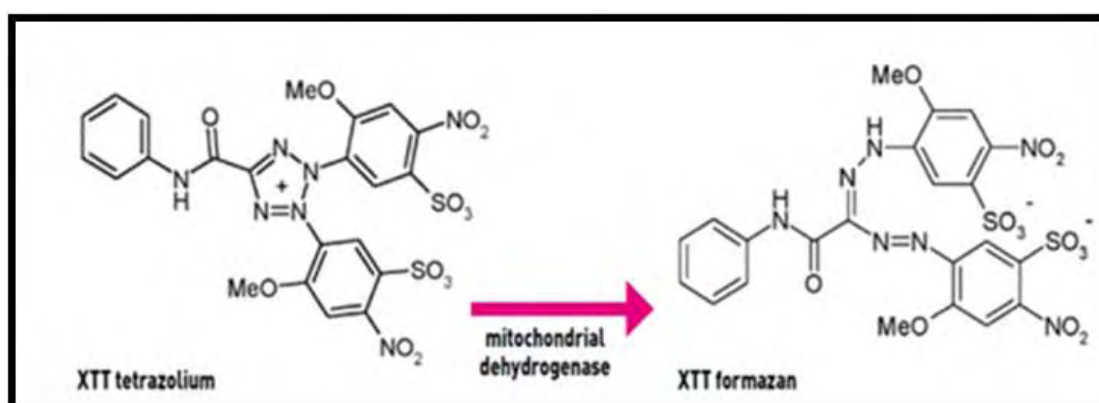
- 250ml DMEM41966
- 2,5ml pen/str
- 2,5ml Γλουταμίνη

- i. Τρυψίνη 0,25% (Gibco)
- ii. PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline 1x) (Gibco)
- iii. Χρωστική Orange mercury (Sigma)
- iv. Χρωστική DCF (Sigma)
- v. FACS Clean (Becton-Dickinson)
- vi. FACS Sheath (Becton-Dickinson)
- vii. FACS Rinse (Becton-Dickinson)
- viii. Cell Proliferation kit II (XTT) (Sigma)

9.2. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος με τη μέθοδο XTT

9.2.1. Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης του εκχυλίσματος στους μυοβλάστες χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche. Η μέθοδος XTT αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για την μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή, έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομέτρηση. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση.



Εικόνα 27: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα.

1.1.1. Πειραματική διαδικασία

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γινόταν μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη 5×10^3 κύτταρων/θέση σε ένα «πιάτο» με 96 θέσεις (96-well plate). Στα κύτταρα γινόταν προσθήκη θρεπτικού υλικού με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO_2 προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του ειδικού «πιάτου» καλλιέργειας. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρούνταν και ακολουθούσε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με την πρωτεΐνη) συνολικού όγκου 100 μl . Τα κύτταρα στα οποία είχαμε προσθέσει τις διαφορετικές συγκεντρώσεις επώαζονταν για 24 ώρες. Μετά την επώαση γινόταν προσθήκη 50 μl από το αντιδραστήριο XTT σε κάθε θέση του 96-well plate και ακολουθούσε επώαση για 4 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το αντιδραστήριο XTT πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων A και B από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των A και B, γίνεται πάντα πριν τη χρησιμοποίησή του. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι το XTT reagent. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν το εκχύλισμα και XTT, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση του εκχυλίσματος επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση του εκχυλίσματος έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή του εκχυλίσματος στην κυτταρική αύξηση των μυοβλαστών C2C12 υπολογίστηκε από τον τύπο:

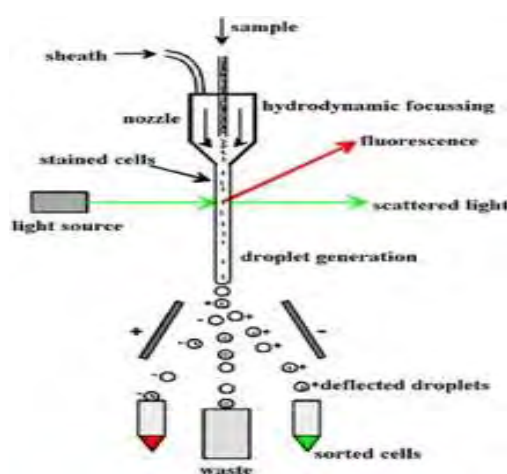
$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα} - O.D. \text{ δείγματος}) / O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα}] \times 10$$

9.3. Κυτταρομετρία Ροής

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτόχρονα πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου (Shapiro, 2003). Ένα άλλο χαρακτηριστικό πλεονέκτημα που δεν το έχει άλλη μέθοδος είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα της πολυπαραμετρικής ανάλυσης του δείγματος συμπεριλαμβανομένου και της θέσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται. Η δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Κάποιες συσκευές κυτταρομετρίας ροής στην αγορά δεν περιλαμβάνουν τους ανιχνευτές φθορισμού και χρησιμοποιούν μόνο τη σκέδαση του φωτός για τις μετρήσεις. Άλλες, παράγουν απεικονίσεις του φθορισμού, της σκέδασης και της έντασης του φωτός για κάθε κύτταρο.

Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων

από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Στη συνέχεια ένα προς ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με δύο έως τέσσερις ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο.



Εικόνα 28: Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.

Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απευθείας σκεδαζόμενο φως (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως (SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο). Εκτός από τη μελέτη των διαφόρων κυτταρικών χαρακτηριστικών, η τεχνική της κυτταρομετρίαςροής είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για διαλογή κυττάρων (cell sorting). Καθώς τα κύτταρα/σωματίδια του εναιωρήματος περνούν από την πηγή φωτός, δύναται εκλεκτικά να φορτισθούν και έτσι κατά την έξοδο τους διαχωρίζονται

ανάλογα με το φορτίο τους, συλλέγοντας με αυτό τον τρόπο καθαρούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το αρχικό μείγμα, με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια.



Εικόνα 29: Το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής από την Becton-Dickinson.

10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

10.1. Μέθοδος Folin–Ciocalteu reagent

Πίνακας 12: Αποτελέσματα της μεθόδου Folin–Ciocalteu reagent , η φαινολική περιεκτικότητα είναι εκφρασμένη σε mg/ml.

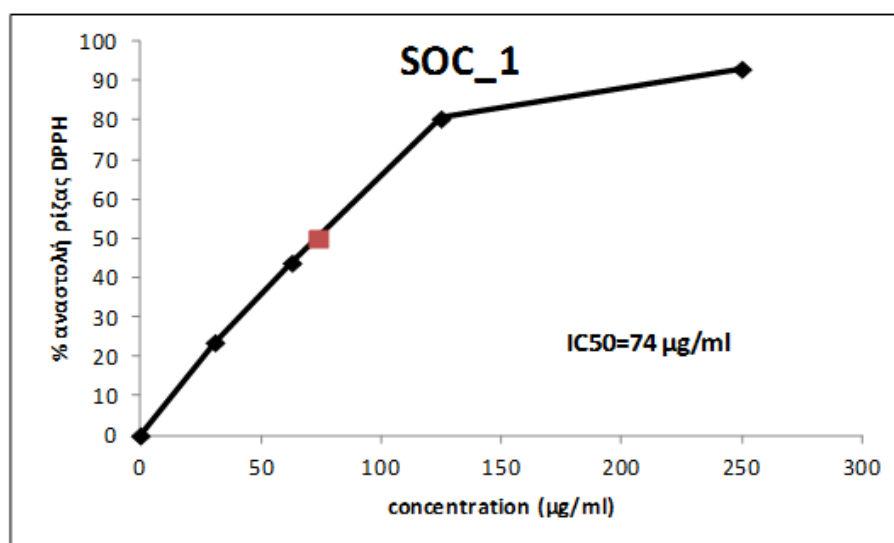
Φυτικό Εκχύλισμα	Συγκέντρωση πολυφαινολικού περιεχομένου (mg GAE/g εκχυλίσματος)
SOC_1	55,91
AREM_3	332,60
KAEM_3	320,10
CSEM_A1	116,75

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι την μεγαλύτερη περιεκτικότητα (συγκέντρωση) σε πολυφαινολικά συστατικά παρουσίασαν 2 φυτικά εκχυλίσματα το AREM και το KAEM με συγκέντρωση 3,3mg/ml σε σχέση με τα άλλα δύο εκχυλίσματα που είχαν πολύ μικρότερη περιεκτικότητα (συγκέντρωση) σε πολυφαινολικά συστατικά.

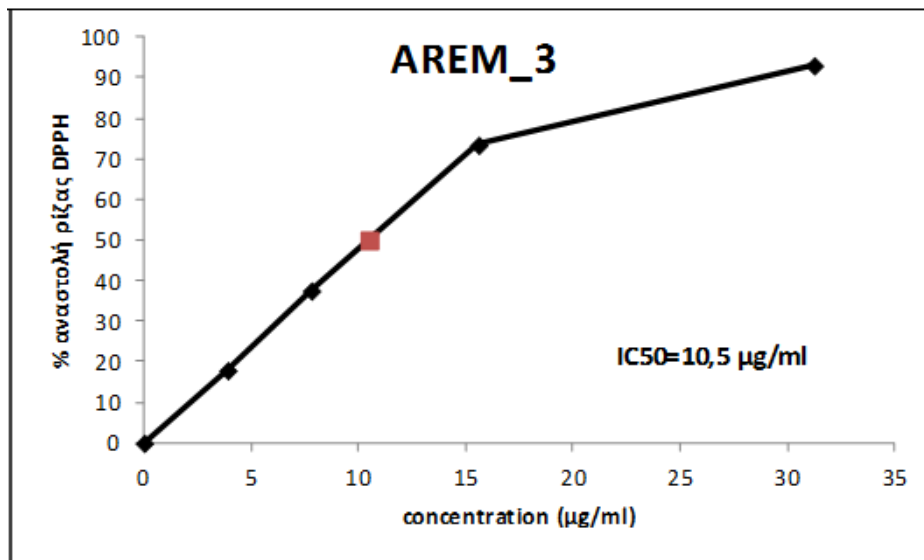
10.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH•

Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 10,5 έως 74 μg/ml . Τα πιο ισχυρά ήταν τα εκχυλίσματα των δειγμάτων AREM και KAEM με IC₅₀ ίσο με 10,5 μg/ml ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος Soc_1 με IC₅₀ ίσο με 74 μg/ml.

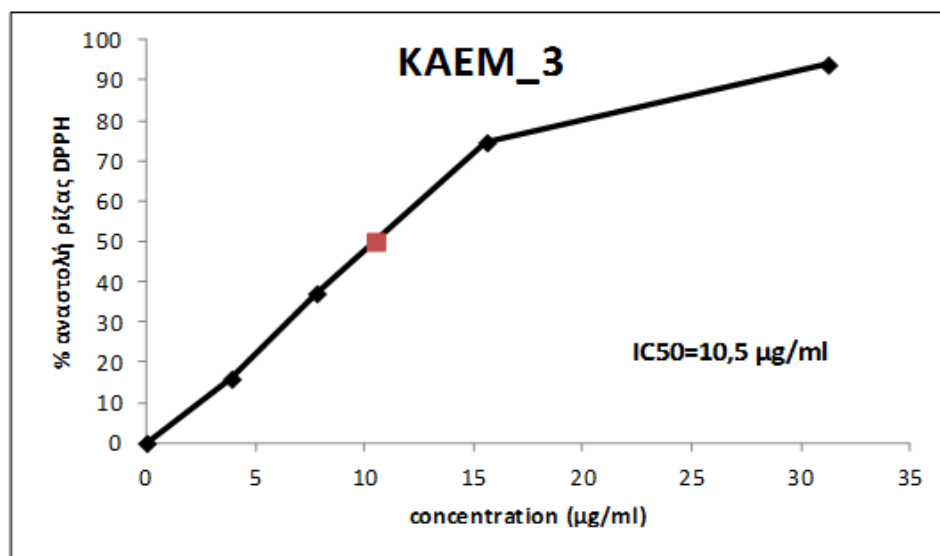
Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα που απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από τα εξετασθέντα εκχυλίσματα.



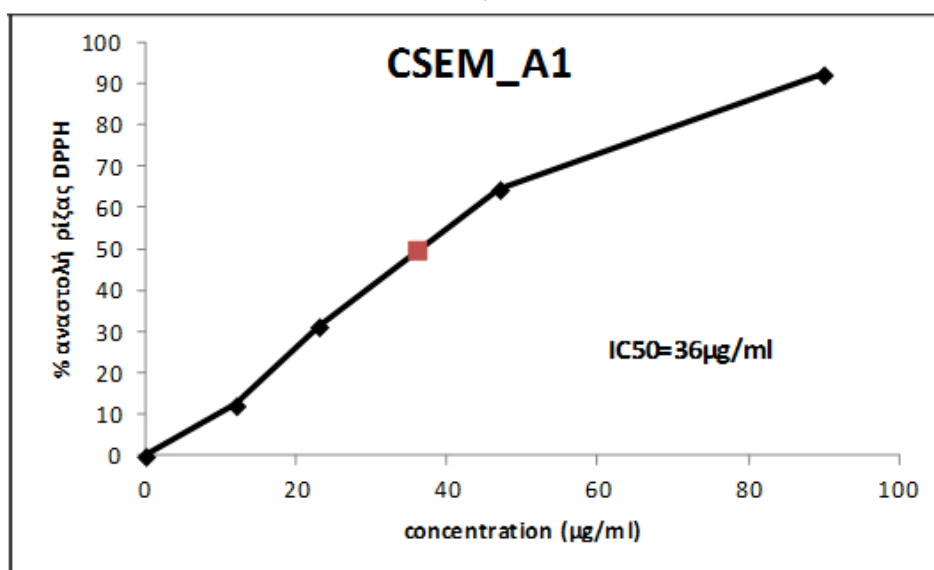
Διάγραμμα 1: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το εκχύλισμα Soc_1.



Διάγραμμα 2: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το εκχύλισμα AREM.



Διάγραμμα 3: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το εκχύλισμα KAEM.

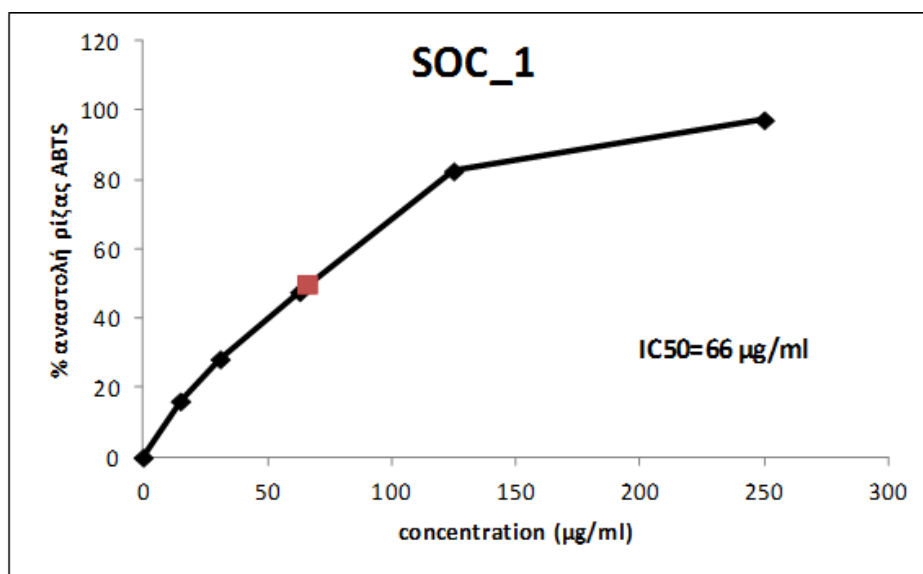


Διάγραμμα 4 : Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το εκχύλισμα CSEM.

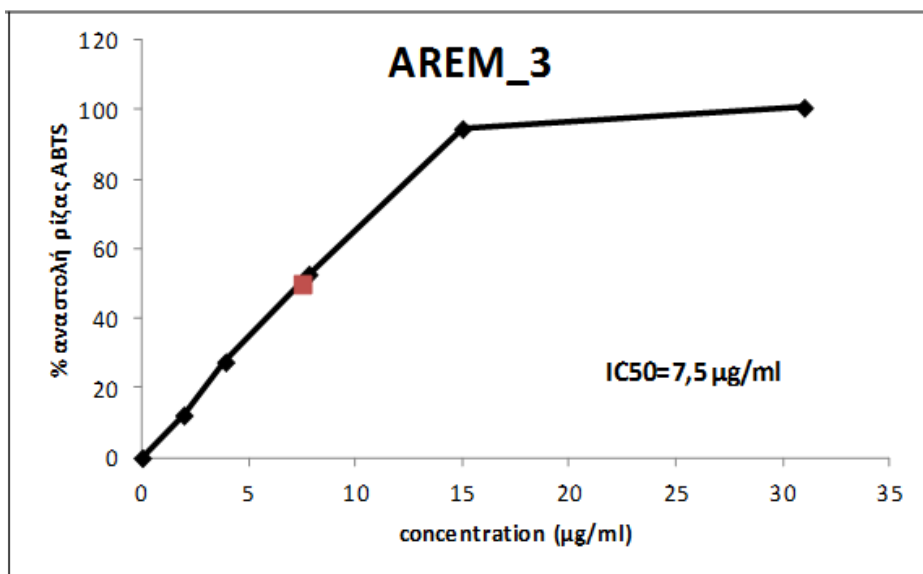
10.3. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS•+

Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 7,5 έως 66 mg/μl. Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος AREM με IC₅₀ ίσο με 7,5 μg/ml ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος Soc_1 με IC₅₀ ίσο με 66 μg/ml.

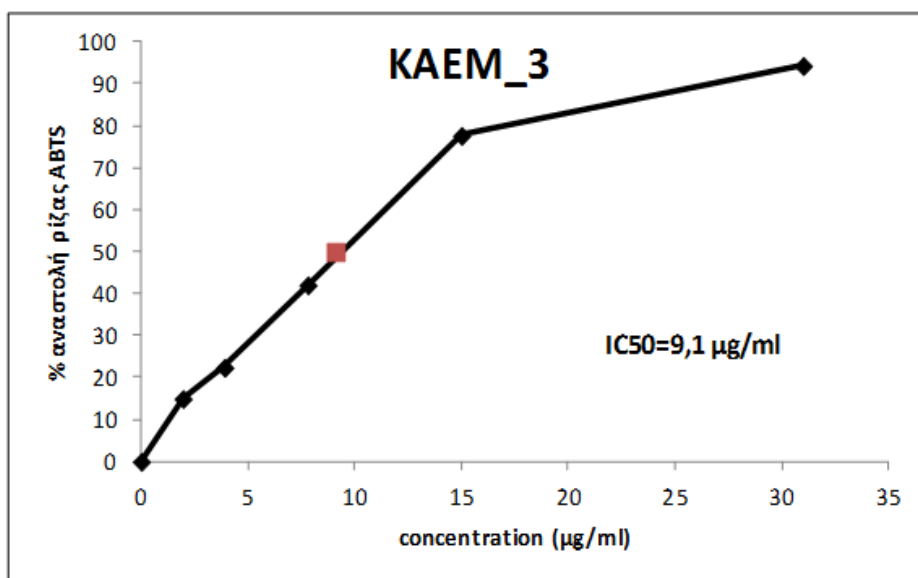
Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα που απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS•+ από τα 4 φυτικά εκχυλίσματα.



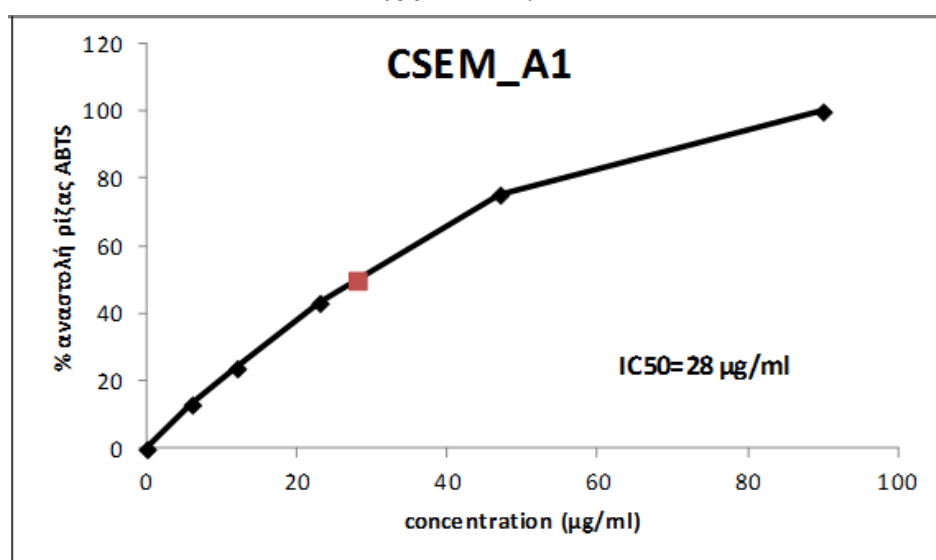
Διάγραμμα 5: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS•+ από το εκχύλισμα του Soc_1.



Διάγραμμα 6: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS•+ από το εκχύλισμα του AREM.



Διάγραμμα 7: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS•+ από το εκχύλισμα του KAEM.

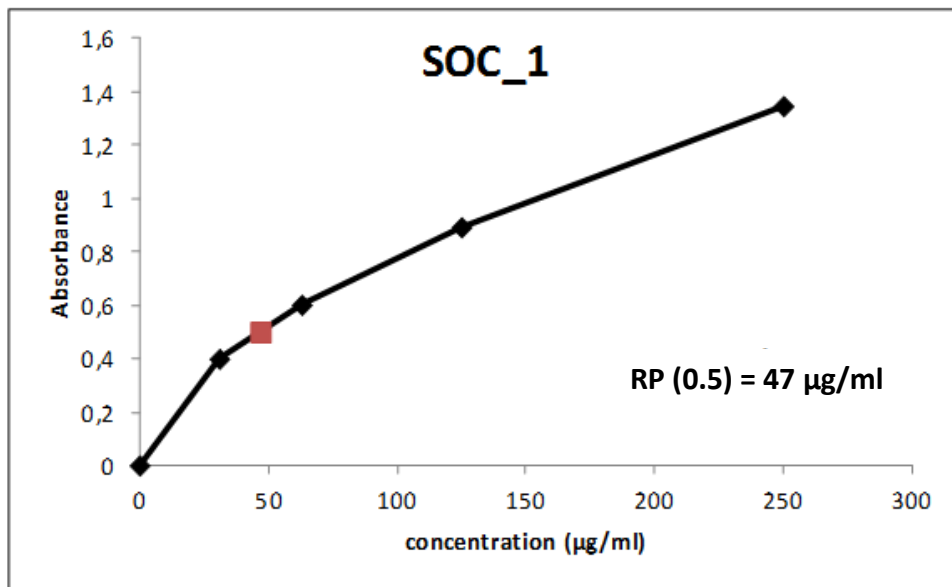


Διάγραμμα 8: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS•+ από το εκχύλισμα του CSEM.

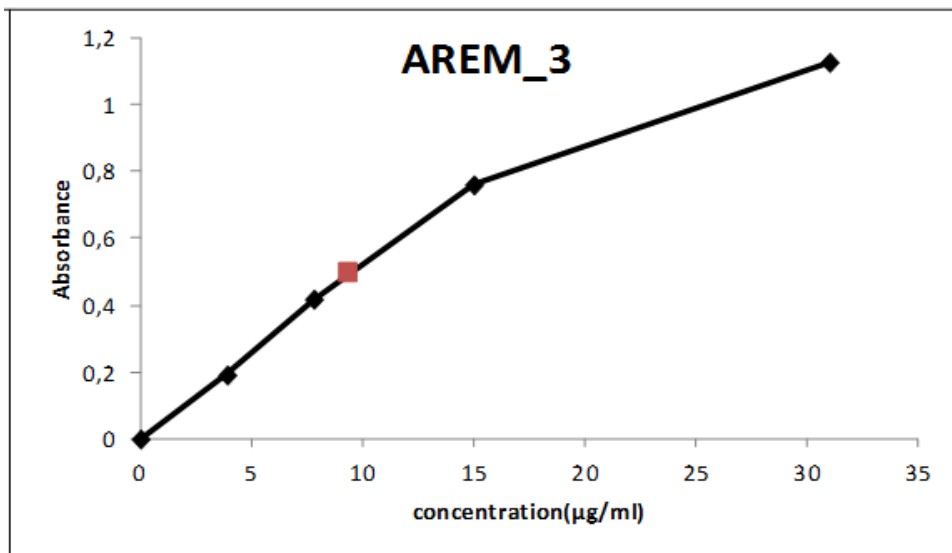
10.4. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με τη ΜΕΘΟΔΟ REDUCING POWER

Η αναγωγική δύναμη υπολογίζεται ως η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί 50% μείωση της απορρόφησης σε σύγκριση με την απορρόφηση του δείγματος ελέγχου (Control).

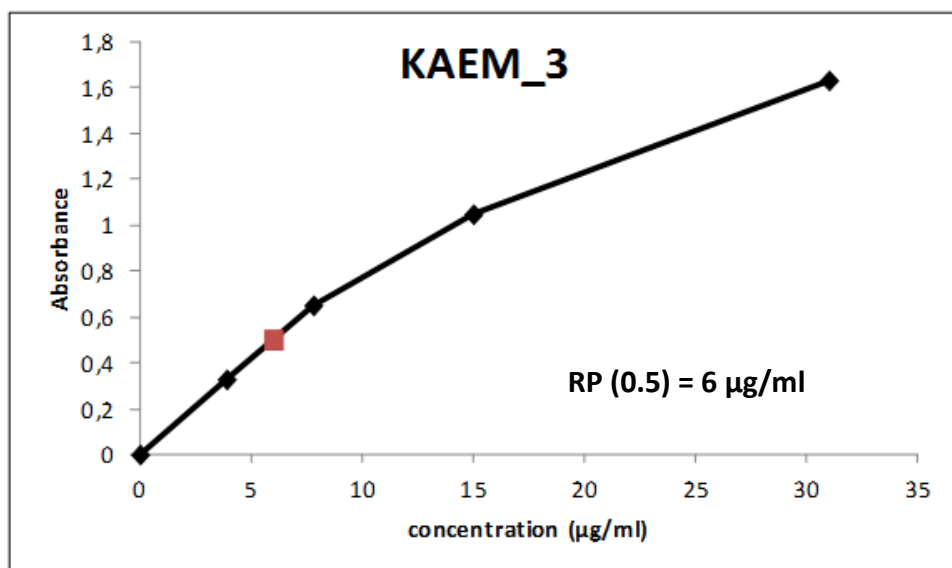
Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική αναγωγική δύναμη. Το εύρος των τιμών RP (0.5) κυμαινόταν από 6 έως 47 mg/μl . Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος KAEM με RP(0.5) ίσο με 6 μg/ml ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος Soc_1 με RP(0.5) ίσο με 47 μg/ml.



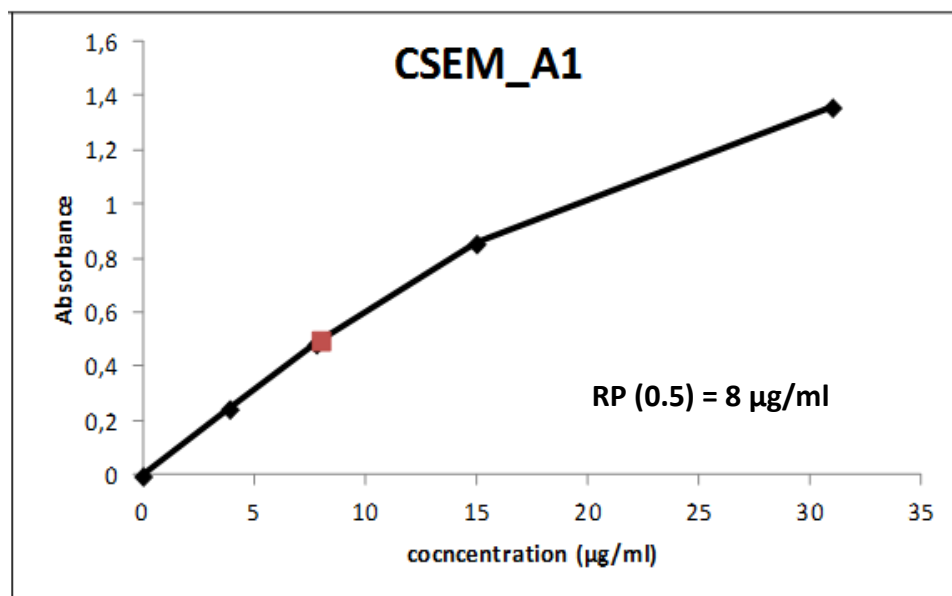
Διάγραμμα 9: Η αναγωγική δύναμη από το εκχύλισμα του Soc_1.



Διάγραμμα 10: Η αναγωγική δύναμη από το εκχύλισμα του AREM.



Διάγραμμα 11: Η αναγωγική δύναμη από το εκχύλισμα του KAEM.



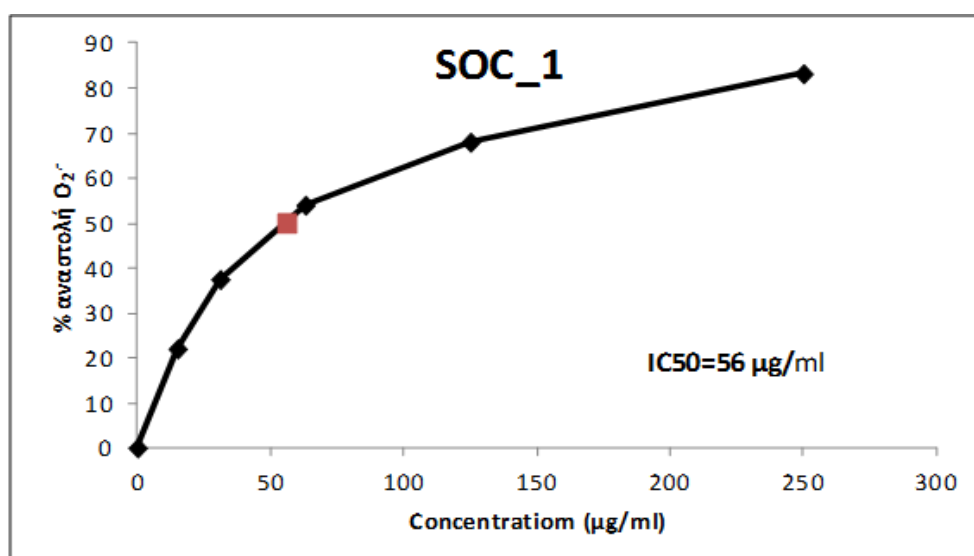
Διάγραμμα 12: Η αναγωγική δύναμη από το εκχύλισμα του CSEM.

10.5. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω εξουδετέρωσης της ρίζας O₂^{-•}.

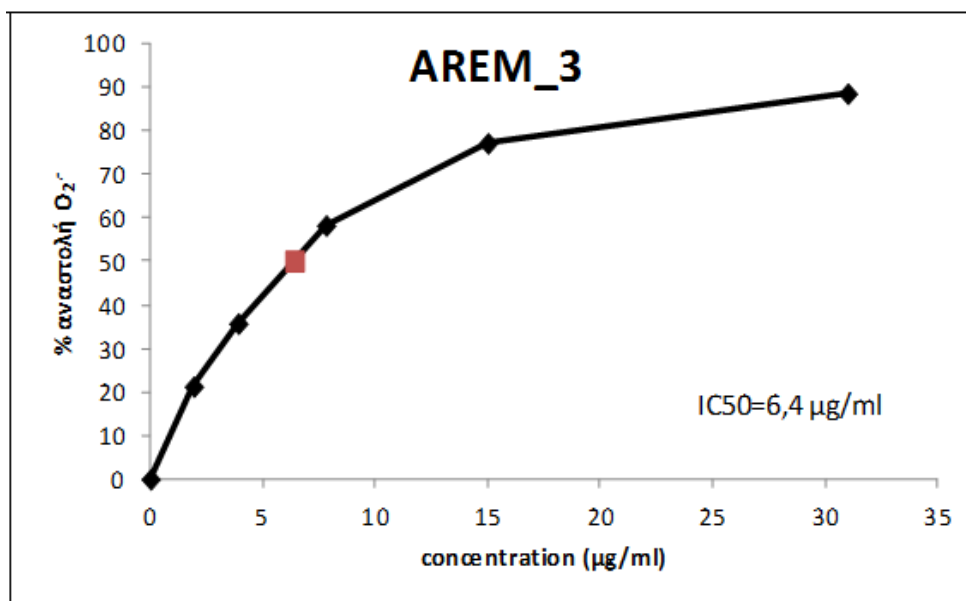
Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας O₂^{-•}.

Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 6,4 έως 56 mg/μl. Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος AREM με IC₅₀ ίσο με 6,4 μg/ml ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος Soc_1 με IC₅₀ ίσο με 56 μg/ml.

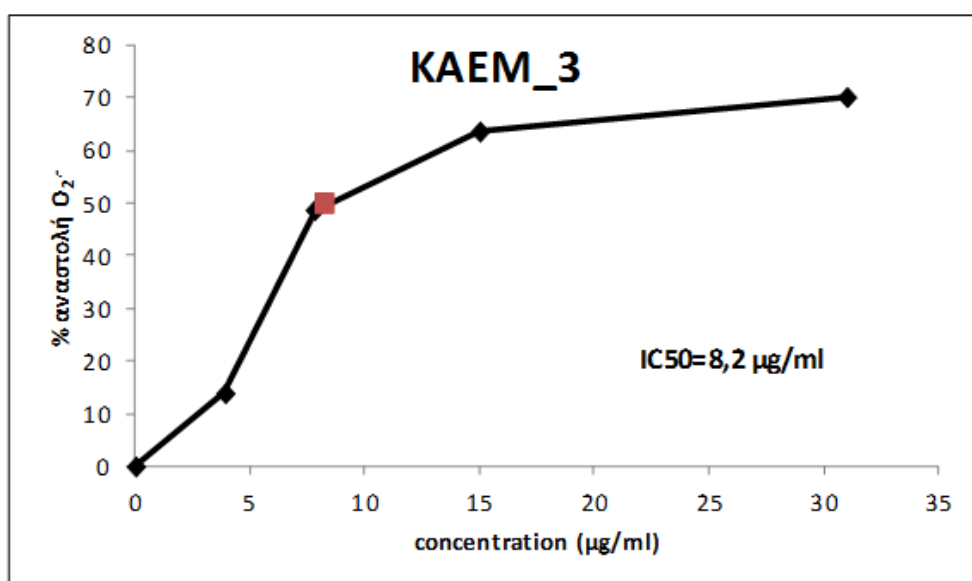
Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα που απεικονίζουν την % εξουδετέρωση της ρίζας από τα εξετασθέντα εκχυλίσματα.



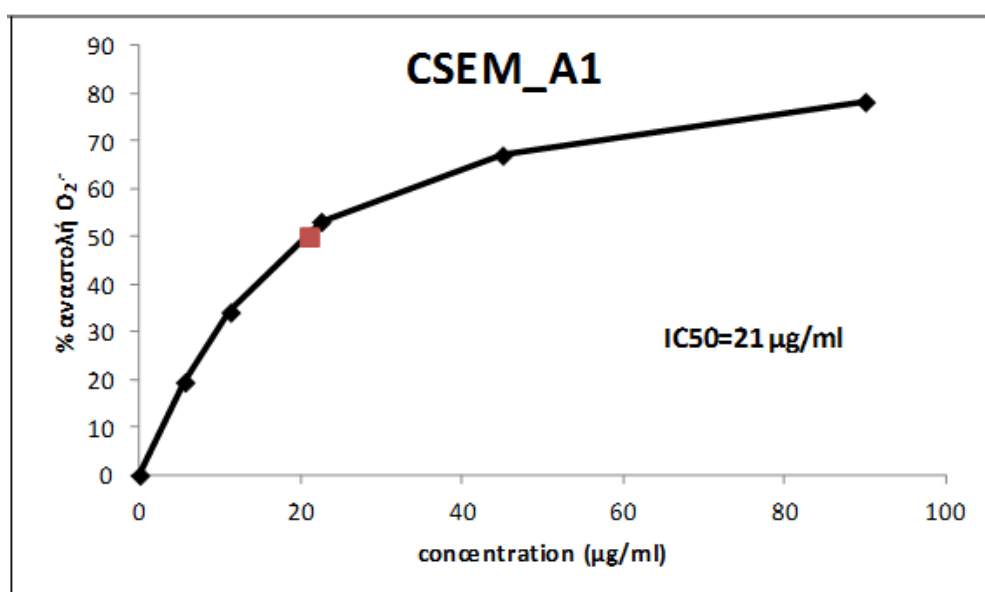
Διάγραμμα 13: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας O₂^{-•} από το εκχύλισμα Soc_1



Διάγραμμα 14: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας O_2^- • από το εκχύλισμα AREM.



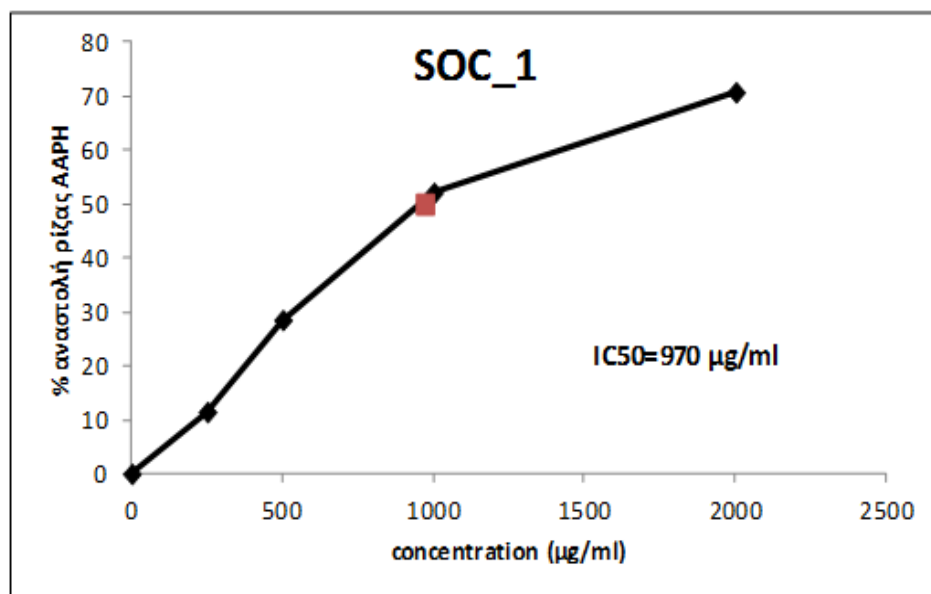
Διάγραμμα 15: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας O_2^- • από το εκχύλισμα KAEM.



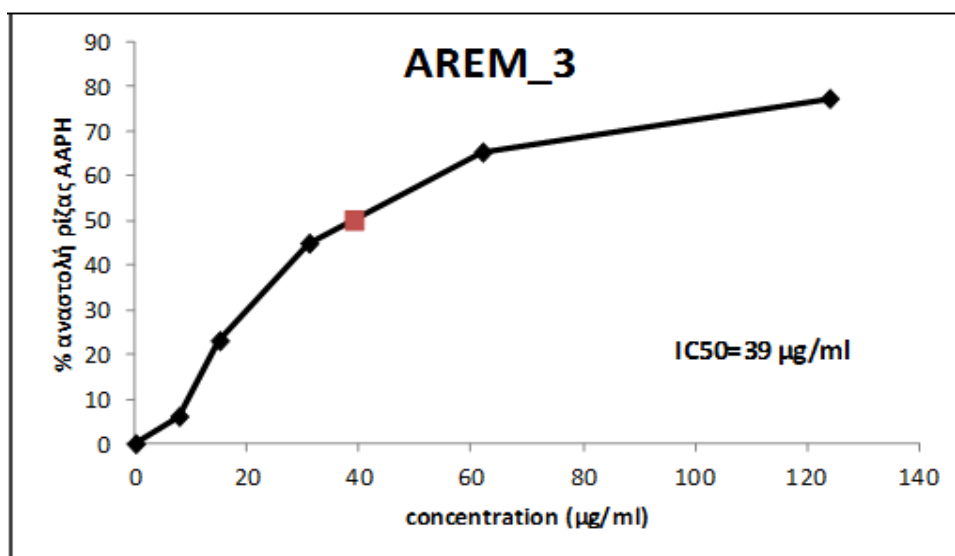
Διάγραμμα 16: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας O_2^- • από το εκχύλισμα CSEM.

10.6. Αποτελέσματα της επίδρασης των φυτικών εκχυλισμάτων στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από τη ρίζα ROO•.

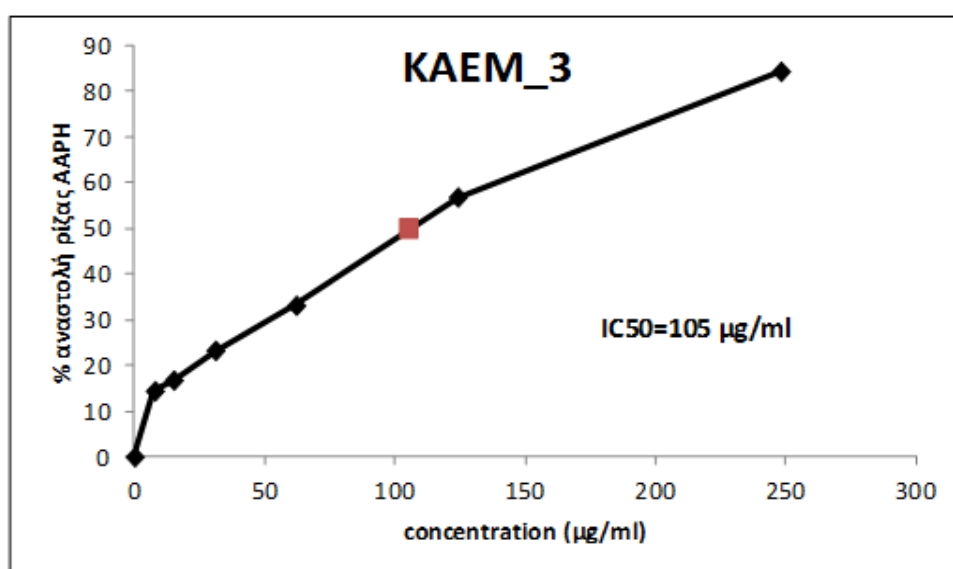
Τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν ανέστειλαν δόσοεξαρτώμενα την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA που δημιουργήθηκαν με τη ρίζα ROO•. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι μπορούν να εξουδετερώνουν τη ρίζα αυτή, παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 39 µg/ml έως 970 µg/ml. Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του AREM με IC₅₀ ίσο με 39 µg/ml ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του Soc_1 με IC₅₀ ίσο με 970 µg/ml



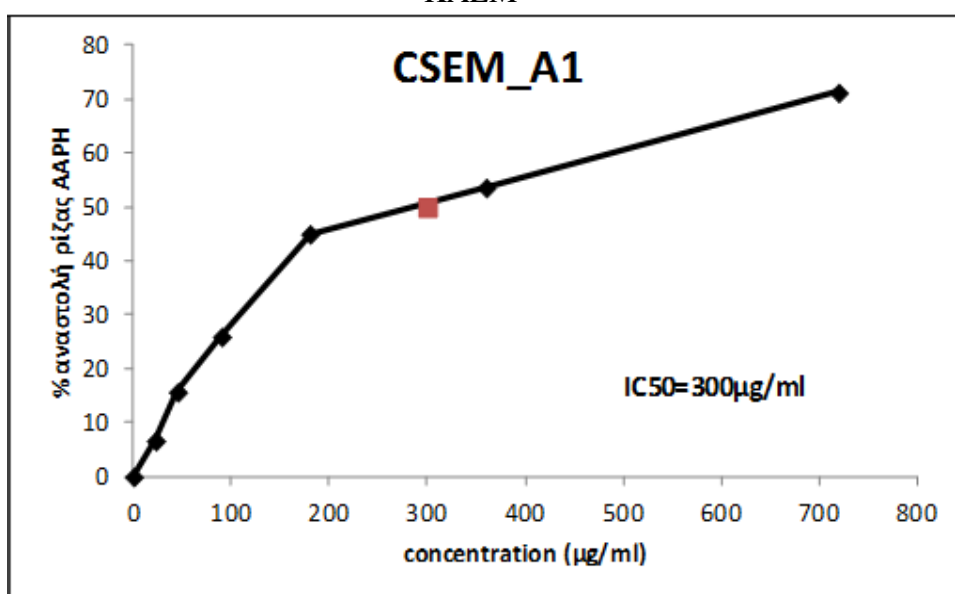
Διάγραμμα 17: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ROO• από το εκχύλισμα Soc_1



Διάγραμμα 18: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας **ROO•** από το εκχύλισμα AREM.



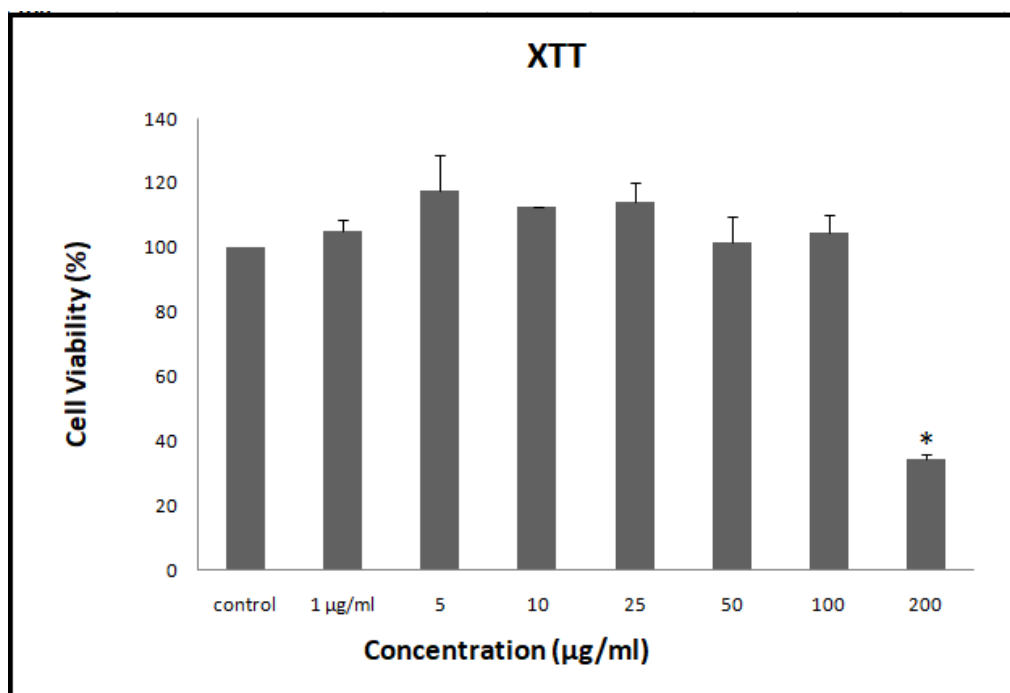
Διάγραμμα 19: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας **ROO•** από το εκχύλισμα KAEM



Διάγραμμα 20 : Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας **ROO•** από το εκχύλισμα CSEM.

10.7. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του φυτικού εκχυλίσματος AREM με τη μέθοδο XTT

Το φυτικό εκχύλισμα AREM του *Cichorium endivia* δεν εμφάνισε καμιά κυτταροτοξική δράση στα μυϊκά κύτταρα C2C12 (στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία (1, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml). ενώ εμφάνισε (στατιστικά σημαντική) κυτταροτοξικότητα στη συγκέντρωση 200 µg/ml (Διάγραμμα 23).

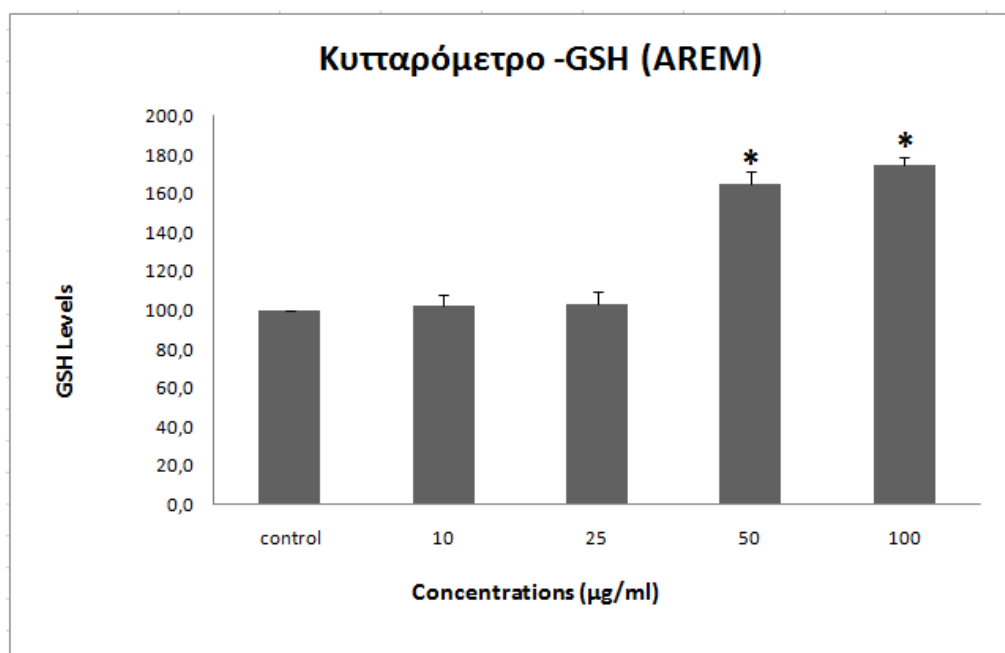


Διάγραμμα 21 :Αποτελέσματα από τη μέθοδο XTT.

10.8. Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH με κυτταρομετρία ροής

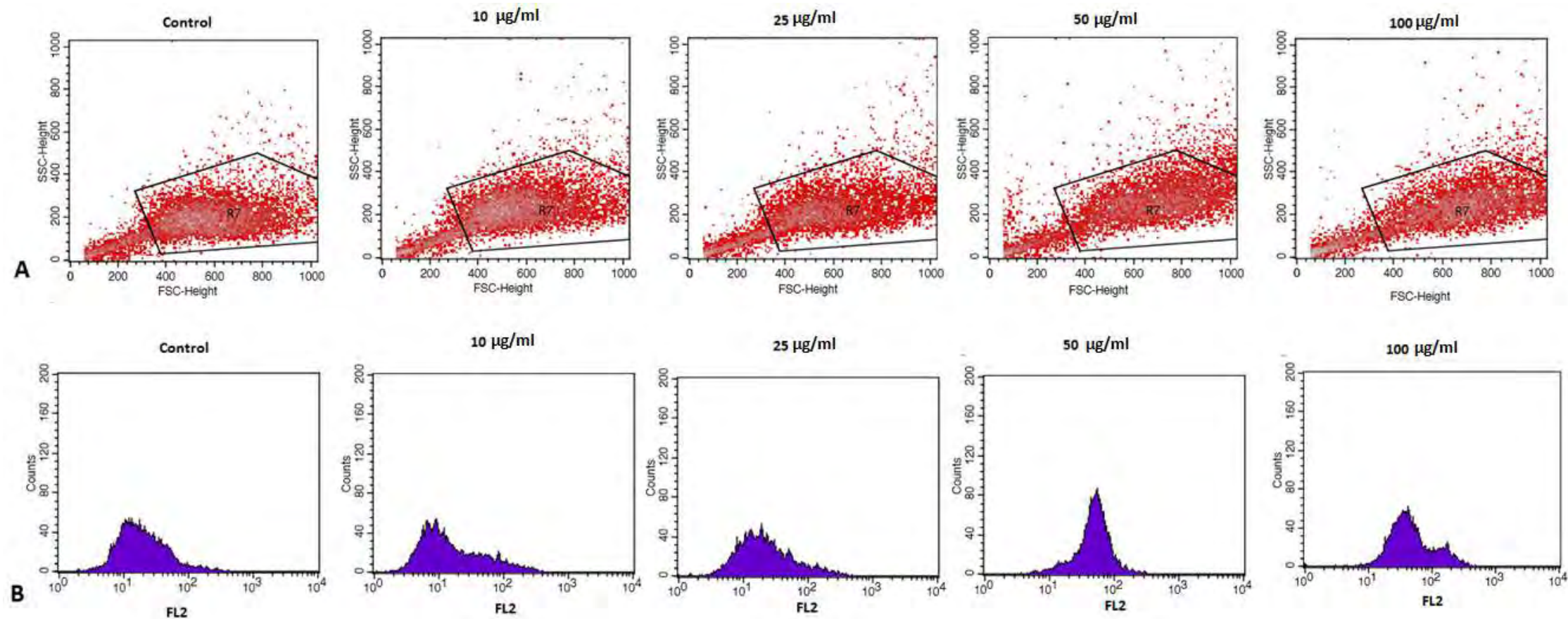
Τα επίπεδα της GSH προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, με τη χρήση της χρωστικής mercury orange.

Ιστογράμματα που παρουσιάζουν το μέγεθος (FSC) και την κοκκίωση (SSC) των κυττάρων για τα μυϊκά κύτταρα C2C12 καθώς και την ένταση φθορισμού της χρωστικής mercury orange παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 23 (σελ.86). Η μέση ένταση φθορισμού επεξεργάστηκε με το λογισμικό BD Cell Quest και οι τιμές παρουσιάζονται ως εκατοστιαία ποσοστά ως προς το control.



Διάγραμμα 22: Αποτελέσματα από τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής για τα επίπεδα GSH. Στο διάγραμμα τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως επίπεδα της GSH σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις του φυτικού εκχυλίσματος AREM (μg/ml).

Όταν προηγήθηκε επεξεργασία των κυττάρων με το φυτικό εκχύλισμα AREM, τα επίπεδα της GSH στα μυϊκά κύτταρα C2C12 αυξήθηκαν κατά 2,70%, 3,30%, 65,30% και 75% σε σχέση με τα επίπεδα της GSH στο δείγμα control, για τις συγκεντρώσεις 10, 25, 50 και 100 μg εκχυλίσματος/ml αντίστοιχα (Διάγραμμα 23). Στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε μόνο στις δύο τελευταίες συγκεντρώσεις 50 μg/ml (65,30%) και 100 μg/ml (75%). Όπως παρατηρείται, επειδή σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του φυτικού εκχυλίσματος έχουμε αυξημένα επίπεδα GSH έχουμε μετατόπιση της καμπύλης προς τα δεξιά.



Διάγραμμα 23 : Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής στα μυϊκά κύτταρα C2C12 για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης (GSH).

(Α) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων και

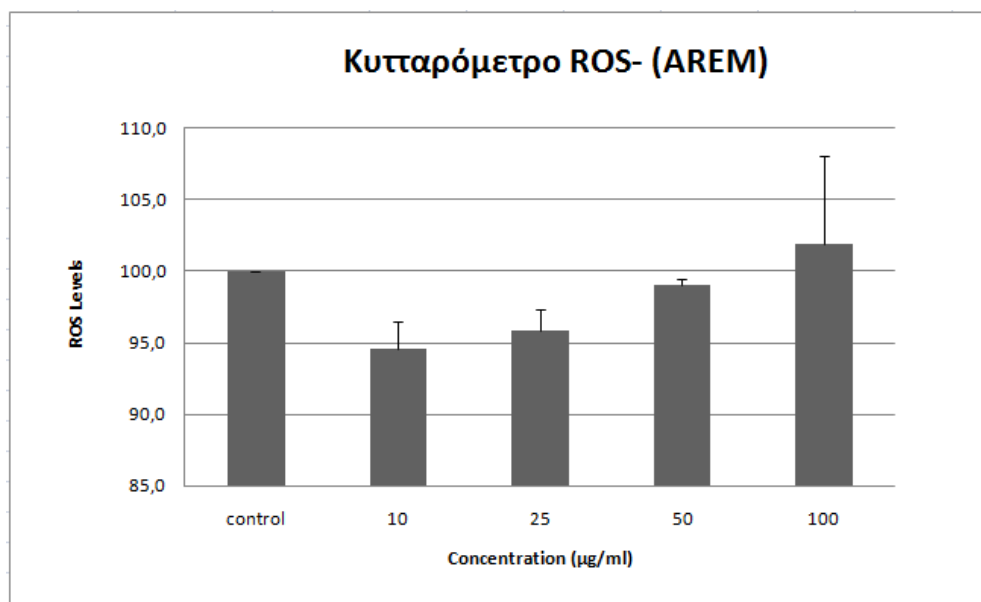
(Β) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με τον φθορισμό τους (10.000 κύτταρα).

Το FL2 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. Τα κύτταρα μελετήθηκαν κάτω από πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις : υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50 και 100 µg/ml.

10.9. Προσδιορισμός των επιπέδων των ROS με κυτταρομετρία ροής

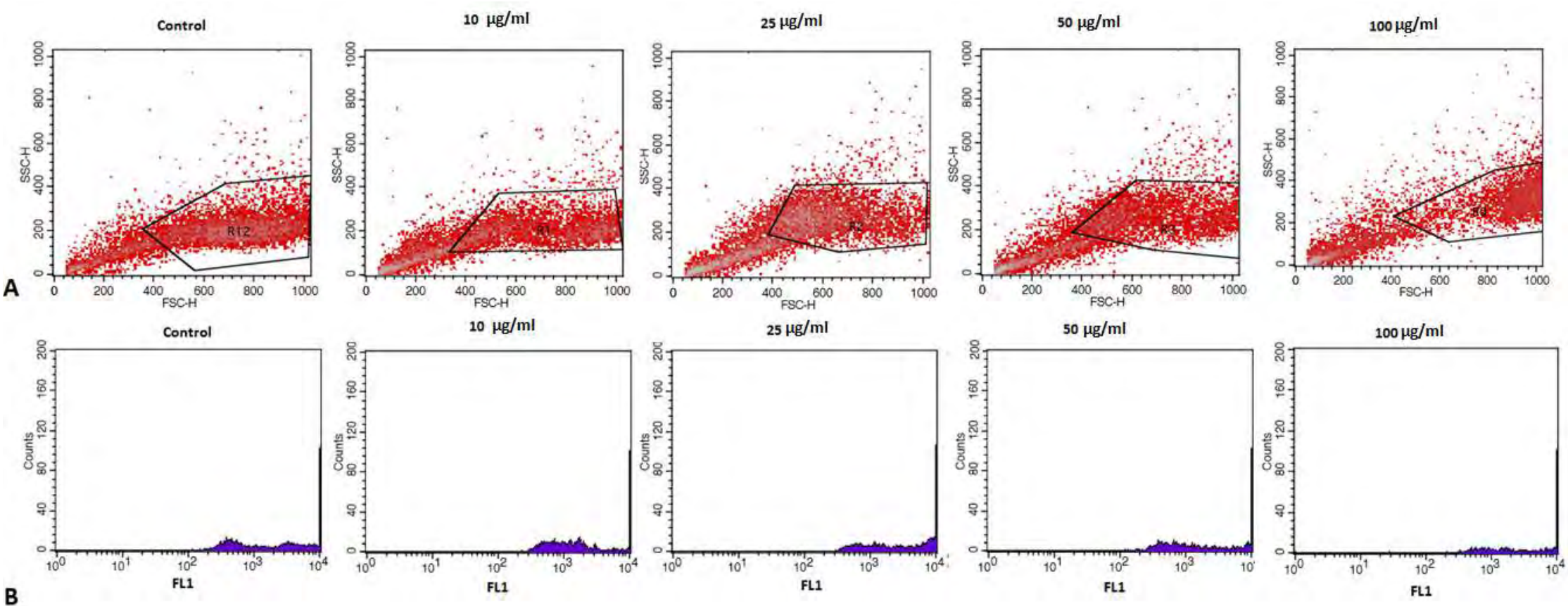
Τα επίπεδα των ROS προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, με τη χρήση της χρωστικής DCF-DA.

Ιστογράμματα που παρουσιάζουν το μέγεθος (FSC) και την κοκκίωση (SSC) των κυττάρων καθώς και την ένταση φθορισμού της χρωστικής mercury orange παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 25** (σελ.88) για τα μυϊκά κύτταρα C2C12. Η μέση ένταση φθορισμού επεξεργάστηκε με το λογισμικό BD Cell Quest και οι τιμές παρουσιάζονται ως εκατοστιαία ποσοστά ως προς το control.



Διάγραμμα 24: Αποτελέσματα από τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής για τα επίπεδα ROS. Στο διάγραμμα τα αποτελέσματα απεικονίζονται ως επίπεδα των ROS σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις του φυτικού εκχυλίσματος AREM (μg/ml).

Όταν προηγήθηκε επεξεργασία των κυττάρων με το φυτικό εκχύλισμα του AREM, τα επίπεδα των ROS στα μυϊκά κύτταρα C2C12 δεν παρουσίασαν κανένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε καμιά από τις συγκεντρώσεις, 10, 25, 50 και 100 μg εκχυλίσματος/ml, που χρησιμοποιήθηκαν (Διάγραμμα 25).



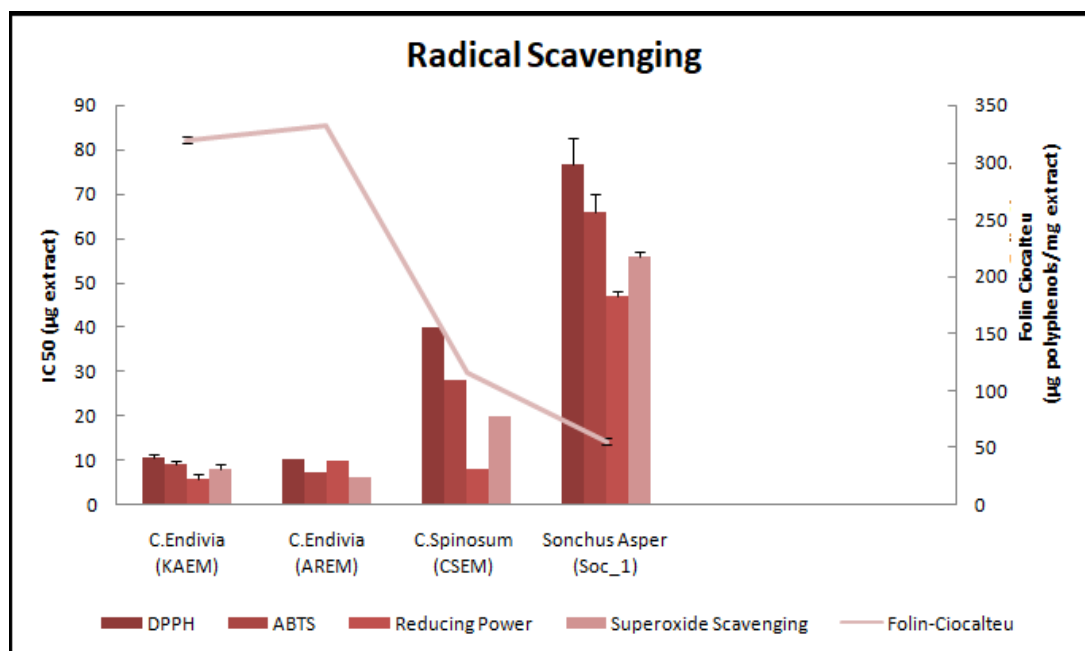
Διάγραμμα 25: Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής στα μυϊκά κύτταρα C2C12 για τον προσδιορισμό των ελευθέρων ριζών (ROS).

(A) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων και

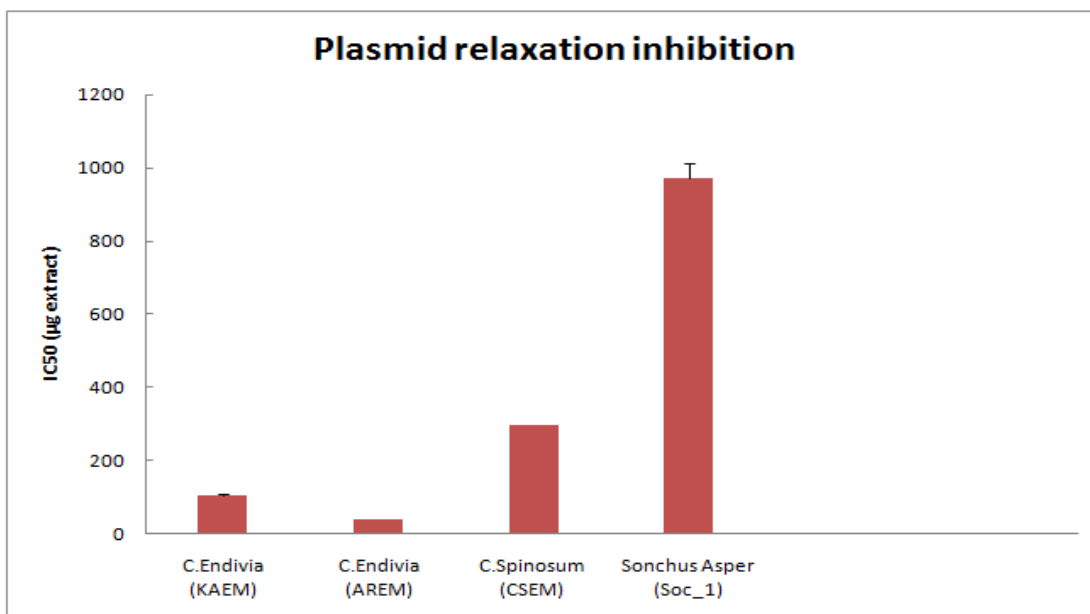
(B) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με τον φθορισμό τους (10.000 κύτταρα).

Το FL1 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. Τα κύτταρα μελετήθηκαν κάτω από πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις : υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και σε συγκεντρώσεις 10, 25, 50 και 100 µg/ml

11. Συγκριτικά Διαγράμματα



Διάγραμμα 26: Στον διάγραμμα φαίνονται συγκριτικά τα αποτελέσματα, και από τα 4 φυτικά εκχυλίσματα, όσον αφορά τη δραστικότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών(DPPH •, ABTS • +, O₂ •), την ικανότητα αναγωγής του τρισθενή σιδήρου και της μεθόδου Folin-Ciocalteu.



Διάγραμμα 27: Στον διάγραμμα φαίνονται συγκριτικά τα αποτελέσματα, και από τα 4 φυτικά εκχυλίσματα, όσον αφορά την ικανότητα τους να αναστέλουν την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από τη ρίζα ROO•.

12. Συζήτηση

Οι ελεύθερες ρίζες (ROS) είναι προϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού. Όταν το οξυγόνο παρέχεται σε περίσσεια ή η μείωση του είναι ανεπαρκής, τότε οδηγούμαστε σε παραγωγή ROS όπως ανιόντα σουπεροξειδίου, υδροξυλικές ρίζες και υπεροξείδιο του υδρογόνου (Aruoma, 1999). Οι ROS μπορεί να είναι ευεργετικές, διότι συμμετέχουν σε ζωτικές λειτουργίες του οργανισμού (Halliwell and Gutteridge, 1989; Miquelán dRomano-Bosca, 2004). Από την άλλη όμως οι ROS αποτελούν αιτιολογικό παράγοντα για πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως η καρκινογένεση, οι καρδιακές παθήσεις, η αρτηριοσκλήρωση, ο διαβήτης και η γήρανση (Duh, 1998; Honda et al., 2004; Tanizawa, et al., 1992; Uchida, 2000).

Ο ρόλος των ROS στην αιτιολογία και εξέλιξη επιβλαβών κλινικών καταστάσεων έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι τα αντιοξειδωτικά μπορεί να λειτουργούν ως προφυλακτικοί παράγοντες. Όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, έχουν αντιοξειδωτικά συστήματα άμυνας, αλλά οι φυσικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί μπορεί να μην είναι επαρκείς. Για αυτό το λόγο η παροχή αντιοξειδωτικών μέσω διατροφικών συστατικών παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον και η ζήτηση για φυσικά αντιοξειδωτικά έχει πρόσφατα αυξηθεί λόγω των αμφιβολιών για την μακροπρόθεσμη ασφάλεια των συνθετικών αντιοξειδωτικών (Yu et al., 2002). Πολλές αντιοξειδωτικές ουσίες έχουν απομονωθεί από φυσικές πηγές, όπως τα βρώσιμα φυτά που τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν οι βιολογικές επιδράσεις και ιδιαίτερα η αντιοξειδωτική δράση 4 φυτικών εκχυλισμάτων: των AREM και KAEM από το φυτό *Cichorium Endivia* και *Cichorium Intybus* αντίστοιχα και του CSEM από το φυτό *Cichorium Spinosum* και τέλος του Soc_1 από το φυτό *Sonchus Asper*.

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα εξής:

1. Η ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών και η αναγωγική δύναμη και των 4 φυτικών εκχυλισμάτων.
2. Η ικανότητα αναστολής από τα 4 εκχυλίσματα των θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA που προκαλούνται από τη ρίζα ROO•.

3. Η προστατευτική δράση του ισχυρότερου φυτικού εκχυλίσματος έναντι του οξειδωτικού στρες, στα μυϊκά κύτταρα C2C12 με κυτταρομετρία ροής.

Τα αποτελέσματα από τη μελέτη της ικανότητας εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών και της αναγωγικής δύναμης των 4 φυτικών εκχυλισμάτων έδειξαν τα εξής:

- i. Στη μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας **DPPH•**, όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα. Το εύρος των τιμών IC50 κυμαινόταν από 10,5 έως 74 mg/ml . Τα πιο ισχυρά ήταν τα εκχυλίσματα των δειγμάτων **AREM και KAEM με IC50 ίσο με 10,5 µg/ml** ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος Soc_1 με IC50 ίσο με 74 µg/ml .
- ii. Στη μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας **ABTS^{•+}**, όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα. Το εύρος των τιμών IC50 κυμαινόταν από 7,5 έως 66 mg/ml . Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος **AREM με IC50 ίσο με 7,5 µg/ml** ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος Soc_1 με IC50 ίσο με 66 µg/ml .
- iii. Στη μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας **O2•-** όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα. Το εύρος των τιμών IC50 κυμαινόταν από 6,4 έως 56 mg/ml . Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος **AREM με IC50 ίσο με 6,4 µg/ml** ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος Soc_1 με IC50 ίσο με 56 µg/ml .
- iv. Στη μέθοδο αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου, όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική αναγωγική δύναμη. Το εύρος των τιμών RP(0,5) κυμαινόταν από 6 έως 47 mg/ml . Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα του δείγματος **KAEM με RP(0,5) ίσο με 6 µg/ml** ενώ το πιο ασθενές ήταν το εκχύλισμα του δείγματος Soc_1 με RP(0,5) ίσο με 47 µg/ml .

Τα εκχυλίσματα ωστόσο μελετήθηκαν και για την ικανότητα τους να αναστέλλουν την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA που δημιουργήθηκαν με τη ρίζα ROO•. Και τα 4 εκχυλίσματα εμφάνισαν δοσοεξαρτώμενη αναστολή, γεγονός που δείχνει ότι μπορούν να εξουδετερώνουν τη ρίζα αυτή, παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Το εύρος των τιμών IC50 κυμαινόταν από 39 µg/ml έως 970 µg/ml, με το πιο ισχυρό το εκχύλισμα αυτό του AREM με IC50 ίσο με 39 µg/ml και πιο ασθενές το εκχύλισμα του Soc_1 με IC50 ίσο με 970 µg/m.

Το εκχύλισμα του *Cichorium endivia* (**AREM**) είχε συνολική πολυφαινολική περιεκτικότητα ίση με 332,60 mg/g εκχυλίσματος Όσον αφορά τη δραστικότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών (DPPH •, ABTS • +, O₂ •), η IC₅₀ είναι 10,5 μg / ml, 7,5 μg / ml και 6,4 μg / ml αντίστοιχα. Στη μέθοδο αναγωγής του τρισθενή σιδήρου η τιμή RP(0,5) είναι ίση με 9,8 μg / ml, ενώ παρουσίασε αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση με τιμή IC₅₀ ίση με 39 μg/ml. Το εκχύλισμα του *Cichorium endivia* (**AREM**) είναι πλούσιο σε φαινολικά οξέα με βασικότερο το κιχορικό οξύ ενώ μεταξύ άλλων περιέχει γλυκοσίδια φλαβονοειδών όπως η λουτεολίνη και η κερκετίνη. Αυτά τα συστατικά του είναι υπεύθυνα για τις ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες που παρουσίασε. Αυτό το εκχύλισμα ήταν το ισχυρότερο από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα στις περισσότερες μεθόδους.

Το εκχύλισμα του *Cichorium intybus* (**KAEM**) είχε συνολική πολυφαινολική περιεκτικότητα 320,10 mg/g εκχυλίσματος Όσον αφορά τη δραστικότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών(DPPH •, ABTS • +, O₂ •), η IC₅₀ ήταν 10,5 μg / ml, 9,1 μg / ml και 8,2 μg / ml αντίστοιχα. Στη μέθοδο αναγωγής του τρισθενή σιδήρου η τιμή RP(0,5) είναι ίση με 6 μg / ml, ενώ παρουσίασε αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση με τιμή IC₅₀ ίση με 105 μg/ml. Το εκχύλισμα του *Cichorium intybus* (**KAEM**)είναι πλούσιο σε φαινολικά οξέα με βασικότερο το κιχορικό οξύ ενώ μεταξύ άλλων περιέχει γλυκοσυλιωμένα φλαβονοειδή όπως η λουτεολίνη και η κερκετίνη, στις οποίες αποδίδονται αντιοξειδωτικές και αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες. Γενικότερα το εκχύλισμα του **KAEM** είναι ένα από τα πιο ισχυρά σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα.

Όσον αφορά το εκχύλισμα του *Cichorium Spinosum* (**CSEM**), η συνολική πολυφαινολική περιεκτικότητά του είναι ίση με 116,75 mg/g εκχυλίσματος Όσον αφορά τη δραστικότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών (DPPH •, ABTS • +, O₂ •),η τιμή IC₅₀ ήταν 36 μg / ml, 28 μg/ml και 21 μg / ml αντίστοιχα. Στη μέθοδο αναγωγής του τρισθενή σιδήρου η τιμή RP(0,5) είναι ίση με 8 μg / ml, ενώ παρουσίασε αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση με τιμή IC₅₀ είναι ίση με 300 μg/ml. Το εκχύλισμα του *Cichorium spinosum* (**CSEM**), έχει βασικό συστατικό το κιχορικό οξύ και είναι πλούσιο σε γλυκοσίδια φλαβονοειδών. Περιέχονται επίσης

σεσκιτερπενικές λακτόνες και άλλα φαινολικά οξέα, τα οποία εξηγούν την αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση του. Το εκχύλισμα αυτό παρουσίασε μια μέτρια δραστηριότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα.

Τέλος το εκχύλισμα του *Sonchus asper* (*Soc_1*) εμφάνισε την μικρότερη συνολική πολυφαινολική περιεκτικότητα ίση με 55,91 mg/g εκχυλίσματος. Όσον αφορά τη δραστηριότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών (DPPH •, ABTS • +, O₂ •), η τιμή IC₅₀ είναι 74 μg / ml, 66 μg/ml και 56 μg / ml αντίστοιχα. Στη μέθοδο αναγωγής του τρισθενή σιδήρου η τιμή RP(0,5) είναι ίση με 47 μg / ml, ενώ παρουσίασε αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση με τιμή IC₅₀ ίση με 970 μg/ml. Το εκχύλισμα του *Sonchus Asper* (*Soc_1*) περιέχει κυρίως γλυκοσίδια φλαβονοειδών και φαινολικά οξέα με βασικότερο το κιχορικό οξύ. Ασθενέστερη είναι η παρουσία σεσκιτερπενικών λακτονών, κάτι που ίσως ευθύνεται στην ασθενέστερη αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση που εμφάνισε σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα.

Συγκριτικά, από τα 4 φυτικά εκχυλίσματα, τη μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών παρουσίασε το εκχύλισμα του AREM από το φυτό Cichorium endivia. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο αυξημένο περιεχόμενο του σε πολυφαινολικά συστατικά κάτι που επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin–Ciocalteu reagent. Για αυτούς τους λόγους το εκχύλισμα του AREM από το φυτό *Cichorium Endivia* επιλέχθηκε για να γίνουν περαιτέρω μελέτες. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του AREM σε μυοβλάστες ποντικού (C2C12). Αρχικά προσδιορίστηκε η κυτταροτοξική συγκέντρωση του AREM με τη μέθοδο XTT και στη συνέχεια τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) και των ελευθέρων ριζών (ROS) με κυτταρομετρία ροής.

Αναλυτικότερα, με τη μέθοδο XTT που πραγματοποιήθηκε για να προσδιορίσουμε την κυτταροτοξική συγκέντρωση του εκχυλίσματος, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα αυτό δεν εμφάνισε τοξική δράση στις συγκεντρώσεις 1-100 μg/ml.

Στη συνέχεια, υπολογίσαμε τα επίπεδα γλουταθειόνης σε κύτταρα που επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις φυτικού εκχυλίσματος *Cichorium endivia* (10, 25, 50, 100 μg/ml) για 24h. Οι μετρήσεις έγιναν με κυτταρομετρία ροής και σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα κύτταρα έπειτα από επώαση μόνο με το φυτικό

εκχύλισμα είχαν υψηλότερα επίπεδα γλουταθειόνης κατά 65,30% και 75% σε σχέση με τα επίπεδα της GSH στο δείγμα control, για τις συγκεντρώσεις 50 και 100 μg εκχυλίσματος/ml αντίστοιχα. Η παρατηρούμενη αύξηση στα επίπεδα γλουταθειόνης επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα, σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε με ένα από τα βασικά συστατικά αυτού του εκχυλίσματος όπως είναι η κερκετίνη, έδειξαν ότι τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) αυξήθηκαν και τα επίπεδα οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) μειώθηκαν σε ομάδες ποντικών που εκτέθηκαν σε αυτήν (M. Zhang et al., 2011). Γενικότερα, όπως αναφέρεται και παρακάτω όλα τα κύρια συστατικά του φυτικού εκχυλίσματος AREM (κιχορικό οξύ, λουτεολίνη και κερκετίνη) συμβάλουν στην αύξηση των επιπέδων γλουταθειόνης (GSH) είτε δρώντας απευθείας στα ένζυμα σύνθεσής της είτε μέσω άλλων μονοπατιών όπως αυτό του Nrf2.

Στα ROS, που επίσης προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής, η επώαση με το φυτικό εκχύλισμα του AREM, στα κύτταρα C2C12 δεν παρουσίασε κανένα στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα σε καμιά από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Γενικότερα δεν υπάρχουν άλλα βιβλιογραφικά δεδομένα ως προς την επίδραση του φυτικού εκχυλίσματος από το *Cichorium endivia* στα επίπεδα των ROS στην ίδια ή σε άλλες κυτταρικές σειρές.

Αποτελέσματα από άλλες μελέτες σε εκχυλίσματα του **C. endivia**, έδειξαν υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες (50 mg φαινολικών / g ελεύθερου εκχυλίσματος) (Chelikani et al., 2004; Djeridane et al., 2006). Αυτές οι μελέτες έχουν δείξει ότι το *C. endivia* είναι πλούσια πηγή σημαντικών βιολογικών δραστικών φλαβονοειδών, φαινολικών οξέων, τριτερπενίων και στεροειδών. Από τα σημαντικότερα φαινολικά οξέα του **C. Endivia**, είναι το κιχορικό οξύ, που λόγω της παρουσίας υδροξυλομάδων στη δομή του παίζει ρόλο αντιοξειδωτικού. Επίσης, συμβάλλει στη ρύθμιση ορισμένων ενζύμων, όπως ξενοβιοτικών ενζύμων της φάσης II και εξαρτώμενων από τη GSH αντιοξειδωτικών ενζύμων (El-Sayed, Lebda, Hassinin, & Neoman, 2015). Επιπλέον μια άλλη μελέτη επιβεβαιώνει τη συμβολή αυτού του φυτού του **C. endivia** στο αμυντικό σύστημα έναντι οξειδωτικής βλάβης λόγω των ενδογενών ελεύθερων ριζών, εξαιτίας των αποτελεσμάτων που έδειξαν υψηλή αναγωγική ισχύ και ικανότητα δέσμευσης ριζών DPPH (Abbas et al., 2014). Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα του κιχορικού οξέος επιβεβαιώθηκε περαιτέρω όταν συγκρίνοντας την ικανότητα πέντε διαφορετικών φυτικών εκχυλισμάτων, αυτό που

ήταν πλούσιο σε κιχωρικό οξύεξουδετέρωσε τη ρίζα DPPH πολύ περισσότερο, (περίπου τέσσερις φορές)σε σύγκριση με τα άλλα εκχύλίσματα(S. A. Petropoulos et al., 2018).

Η λουτεολίνη είναι επίσης ένα από τα κυριότερα φλαβονοειδή του *C. endivia* το οποίο σε άλλες μελέτες που διεξήχθησαν φάνηκε να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες DPPH, να προκαλεί αύξηση της εξαρτώμενης από το στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης (ARE) μεταγραφικής δραστηριότητας και να αυξάνει τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, ενεργοποιώντας το μονοπάτι Keap1-Nrf2-ARE. Όταν ο παράγοντας μεταγραφής Nrf2 συνδέεται με το στοιχείο ARE, στην περιοχή γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα της φάσης II, αυτό οδηγεί στην επαγωγή τους. Το μονοπάτι Keap1-Nrf2-ARE είναι πολύ σημαντικό για τον συντονισμό της έκφρασης ξενοβιοτικών ενζύμων της φάσης II (π.χ. GST) και αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η NADPH οξειδάση(Y. C. Zhang, Gan, Shelar, Ng, & Chew, 2013).

Η κερκετίνη ανήκει στην τάξη των βιοφλαβονοειδών και επίσης αποτελεί ένα από τα συστατικά που βρίσκονται σε μεγάλη ποσότητα στο φυτικό εκχύλισμα του *C. endivia*. Μελέτες έχουν δείξει ότι είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, αφού αποτελεί ένα από τους ισχυρότερους εξουδετερωτές των ROS, συμπεριλαμβανομένης της ρίζας O²⁻ (Hanasaki et al., 1994, Cushnie and Lamb, 2005). Αυτές οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της κερκετίνης αποδίδονται στην παρουσία δύο αντιοξειδωτικών χημικών ομάδων στο μόριο που έχουν τη βέλτιστη διαμόρφωση για την απομάκρυνση ελευθέρων ριζών, δηλαδή την ομάδα κατεχόλης στον δακτύλιο B και την ομάδα OH στη θέση 3 του δακτυλίου AC (Heijnen et al., 2002). Επιπλέον, η κερκετίνη φαίνεται να ενισχύει ουσιαστικά την ενδογενή αντιοξειδωτική άμυνα λόγω της συνεισφοράς της στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος που είναι 6 φορές υψηλότερη από τη συνεισφορά της βιταμίνης C και του ουρικού οξέος μαζί. (Boots, Haenen, & Bast, 2008).

Συνοψίζοντας από τα παραπάνω, το πολυφαινολικό εκχύλισμα AREM από το φυτό *Cichorium Endivia* παρουσίασε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Το εκχύλισμα αυτό, όπως προαναφέρθηκε είναι πλούσιο σε κιχωρικό οξύ, λουτεολίνη και κερκετίνη, γεγονός που ίσως εξηγεί την ισχυρή του αντιοξειδωτική δράση. Έτσι, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι αυτό το εκχύλισμα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για δημιουργία βιολειτουργικών τροφίμων ή συμπληρωμάτων διατροφής με αντιοξειδωτική δράση.

13. Βιβλιογραφική Αναφορά

- Παπαγαλάνης, Ν. (2014). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα Ι. Δραστικές ρίζες οξυγόνου, 26(3), 151–194.
- Abbas, Z. K., Saggu, S., Sakeran, M. I., Zidan, N., Rehman, H., & Ansari, A. A. (2014). Phytochemical, antioxidant and mineral composition of hydroalcoholic extract of chicory (*Cichorium intybus* L.) leaves. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(3), 322–326. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.11.015>
- Adlercreutz, H. (2007). Lignans and human health. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 44(5–6), 483–525. <https://doi.org/10.1080/10408360701612942>
- Antunes, F., Han, D., & Cadenas, E. (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(9), 1260–1267. Journal Article, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Aqil, F., Munagala, R., Vadhanam, M. V., Kausar, H., Jeyabalan, J., Schultz, D. J., & Gupta, R. C. (2012). Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 49(1), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.059>
- Baliga, M. S., Haniadka, R., Pereira, M. M., D'Souza, J. J., Pallaty, P. L., Bhat, H. P., & Popuri, S. (2011). Update on the chemopreventive effects of ginger and its phytochemicals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(6), 499–523. <https://doi.org/10.1080/10408391003698669>
- Battin, E. E., & Brumaghim, J. L. (2009). Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 55(1), 1–23. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9054-7>
- Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American Journal of Physiology*, 271(5 Pt 1), C1424–37. Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S., Review.
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants-Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228–237. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Camire, M. (2002). *Phytochemicals in the Vaccinium family: bilberries, blueberries, and cranberries. Phytochemicals in nutrition and health*. Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=cJHsMALUDj0C&oi=fnd&pg=PA19&dq=phytochemicals+and+diabetes&ots=gJWBqxpTyh&sig=TGxwoUqe9ftiFUpcPb1WIMVeE4>

- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481–493.
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 61(2), 192–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321–1342. <https://doi.org/10.3390/ijms11041321>
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., & Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 65(4), 337–353.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(11), 1102–1115. Journal Article, Review.
- El-Sayed, Y. S., Lebda, M. A., Hassinin, M., & Neoman, S. A. (2015). Chicory (*Cichorium intybus* L.) root extract regulates the oxidative status and antioxidant gene transcripts in CCl4-induced hepatotoxicity. *PLoS ONE*, 10(3), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121549>
- GILBERT, D. L. (2006). Fifty Years of Radical Ideas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06172.x>
- Giles, G. I., & Jacob, C. (2002). Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biological Chemistry*, 383(3–4), 375–388. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.042>
- Green, H. J., & Fraser, I. G. (1988). Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 20(1), 55–59. Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 41(12 Pt 2), 1819–1828.
- Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging*, 18(9), 685–716.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1–85.
- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), 950–988. <https://doi.org/10.3390/i8090950>
- Harborne, J. B. (1986). Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Progress in Clinical and Biological Research*, 213, 15–24. Journal Article, Review.
- Harnly, J. M., Doherty, R. F., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Bhagwat, S., & Gebhardt, S. (2006). Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9966–9977. <https://doi.org/10.1021/jf061478a>
- Hart, J. H., & Hillis, W. E. (1974). Inhibition of wood-rotting fungi by stilbenes and other

polyphenols in *Eucalyptus sideroxylon*. *Phytopathology*.
<https://doi.org/10.1094/Phyto-64-939>

- Hertog, M. G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., ... Nedeljkovic, S. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*, 155(4), 381–386.
- Huber, B., Eberl, L., Feucht, W., & Polster, J. (2003). Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 58(11–12), 879–884.
- Innocenti, M., Gallori, S., Giaccherini, C., Ieri, F., Vincieri, F. F., & Mulinacci, N. (2005). Evaluation of the phenolic content in the aerial parts of different varieties of *Cichorium intybus* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6497–6502.
<https://doi.org/10.1021/jf050541d>
- Iovine, N. M., Pursnani, S., Voldman, A., Wasserman, G., Blaser, M. J., & Weinrauch, Y. (2008). Reactive nitrogen species contribute to innate host defense against *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 76(3), 986–993.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01063-07>
- Kaplan, M., Hayek, T., Raz, A., Coleman, R., Dornfeld, L., Vaya, J., & Aviram, M. (2001). Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *The Journal of Nutrition*, 131(8), 2082–2089. Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrouf, Z., Spiegelhalder, B., ... Owen, R. W. (2003). Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 12(1), 67–75.
<https://doi.org/10.1097/01.cej.0000051106.40692.d3>
- Khan, M. R., Badar, I., & Siddiquah, A. (2011). Prevention of hepatorenal toxicity with *Sonchus asper* in gentamicin treated rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(1), 113. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-113>
- Khan, R. A., Khan, M. R., Sahreen, S., & Shah, N. A. (2012). Hepatoprotective activity of *Sonchus asper* against carbon tetrachloride-induced injuries in male rats: a randomized controlled trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 1070.
<https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-90>
- Krinsky, N. I. (2002). Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 540S–542S.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., ... Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113 Suppl, 71S–88S.
- Kushi, L. H., Doyle, C., McCullough, M., Rock, C. L., Demark-Wahnefried, W., Bandera, E. V., ... Gansler, T. (2012). American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical

- activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62(1), 30–67.
<https://doi.org/10.3322/caac.20140>
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T., Cardinali, A., & Amendola, V. (2006). *Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects*. *Phytochemistry* (Vol. 661).
- Liu, Y., Hartley, D. P., & Liu, J. (1998). Protection against carbon tetrachloride hepatotoxicity by oleanolic acid is not mediated through metallothionein. *Toxicology Letters*, 95(2), 77–85.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.
- Markoulis, N., Gourgoulialis, K. I., Moulas, A., Gerogianni, E., & Molyvdas, A. P. (2006). Reactive oxygen metabolites as an index of chronic obstructive pulmonary disease severity. *Panminerva Medica*, 48(4), 209–213. Journal Article.
- Mennen, L. I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., & Scalbert, A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr*, 81(1), 326S–329. Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/cgi/content/long/81/1/326S>
- Miller, J. K., Brzezinska-Slebodzinska, E., & Madsen, F. C. (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science*, 76(9), 2812–2823.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77620-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77620-1)
- Of, A., Medicine, H., & Harman, D. (2009). REVIEW Οξειδωτικό stress – αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί Κλινική σημασία. *Archives of Hellenic Medicine*.
- Pani, G., Galeotti, T., & Chiarugi, P. (2010). Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Reviews*, 29(2), 351–378. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9225-4>
- Papetti, A., Daglia, M., Grisoli, P., Dacarro, C., Gregotti, C., & Gazzani, G. (2006). Anti- and pro-oxidant activity of Cichorium genus vegetables and effect of thermal treatment in biological systems. *Food Chemistry*, 97(1), 157–165.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.036>
- Petropoulos, S. A., Fernandes, Â., Vasileios, A., Ntatsi, G., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Chemical composition and antioxidant activity of Cichorium spinosum L. leaves in relation to developmental stage. *Food Chemistry*, 239, 946–952.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.043>
- Petropoulos, S., Fernandes, Â., Karkanis, A., Ntatsi, G., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Successive harvesting affects yield, chemical composition and antioxidant activity of Cichorium spinosum L. *Food Chemistry*, 237, 83–90.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.092>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Pokkaew, R., Wang, S. H., Liu, C. D., Huang, F. L., Chang, J. C., Lo, C. Y., & Chiou, R. Y. Y. (2013). Properties and characterization of antioxidant and antiglycative activities for

- the multiple harvests of aquatic- and field-cultivated peanut leaves and stems. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.11.003>
- Poljsak, B. (2011). Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/194586>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouysegur, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 50(3), 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Min Yang, A., & Catherine, R.-E. (1999). Antioxidant Activity Applying an improved ABTS radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(98), 1231–1237.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(7), 933–956.
- Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M. K., Trost, A., & Richter, K. (2015). Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*, 5(2), 545–89. <https://doi.org/10.3390/biom5020545>
- Rodrigo, R., Libuy, M., Feliu, F., & Hasson, D. (2014). Polyphenols in disease: from diet to supplements. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15(4), 304–317.
- Schwartz, G. G. (2014). Vitamin D in blood and risk of prostate cancer: lessons from the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial and the Prostate Cancer Prevention Trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 23(8), 1447–1449. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0520>
- Sengupta, A., Ghosh, S., & Bhattacharjee, S. (2004). Allium vegetables in cancer prevention: an overview. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 5(3), 237–245.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3C), 31S–38S.
- Sinković, L., Demar, L., Nidarović, D., Vidrih, R., Hribar, J., & Treutter, D. (2015). Phenolic profiles in leaves of chicory cultivars (*Cichorium intybus* L.) as influenced by organic and mineral fertilizers. *Food Chemistry*, 166, 507–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.024>
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1997). Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry*, 30(2), 91–113.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Vainio, H. (1999). Chemoprevention of cancer: a controversial and instructive story. *British Medical Bulletin*, 55(3), 593–599. Journal Article, Review.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Wang, Z.-H., Gao, Q.-Y., & Fang, J.-Y. (2012). Green tea and incidence of colorectal cancer: evidence from prospective cohort studies. *Nutrition and Cancer*, 64(8), 1143–1152. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.718031>
- Weisburger, J. H. (2001). Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 226(10), 891–897.
- World Cancer Research Fund, & American Institute for Cancer Research. (2007). *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Cancer Research*.
- Zhang, M., Swarts, S. G., Yin, L., Liu, C., Tian, Y., Cao, Y., ... Okunieff, P. (2011). Antioxidant properties of quercetin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 701, 283–289. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7756-4_38
- Zhang, Y. C., Gan, F. F., Shelar, S. B., Ng, K. Y., & Chew, E. H. (2013). Antioxidant and Nrf2 inducing activities of luteolin, a flavonoid constituent in *Ixeris sonchifolia* Hance, provide neuroprotective effects against ischemia-induced cellular injury. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.058>
- https://en.wikipedia.org/wiki/Sonchus_asper
- Sofowara, A. (1993) *Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa*. Spectrum Books Ltd., Ibadan, Nigeria
- María Francisca Molina, Isabel Sanchez-Reus, Irene Iglesias, Juana Benedi, (2003), Quercetin, a Flavonoid Antioxidant, Prevents and Protects against Ethanol-Induced Oxidative Stress in Mouse Liver